

**Untersuchungen zur Regulation der ADAMTS13-Expression und
–Sekretion in Leberzellen der Kulturlinien LX-2 und Hep-G2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von
Katharina Kunze
geb. am 21.09.1985 in Plauen

Erster Gutachter: Prof. Dr. James Friderich Beck, Klinik für Kinder- &
Jugendmedizin Universitätsklinikum Jena

Zweiter Gutachter: PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus, Experimentelle
Anästhesiologie Universitätsklinikum Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Barbara Zieger, Zentrum für Kinder und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2011

I.) Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung.....	11
3	Grundlagen.....	12
3.1	Von-Willebrand-Faktor	12
3.1.1	Struktur	12
3.1.2	Synthese	12
3.1.3	Regulation und Funktion in der Hämostase	13
3.1.4	Von-Willebrand-Faktor-assoziierte Krankheiten	14
3.2	Von-Willebrand-Faktor-spaltende Protease – ADAMTS13.....	15
3.2.1	Struktur	15
3.2.2	Synthese und Sekretion	15
3.2.3	ADAMTS13-Synthese in der Leber	16
3.2.4	ADAMTS13-Synthese in Endothelzellen.....	16
3.2.5	ADAMTS13-Sekretion in der Niere	17
3.2.6	Funktion	17
3.2.7	ADAMTS13 und die thrombotische thrombozytopenische Purpura	18
3.2.8	ADAMTS13 und Inflammation.....	20
3.2.9	ADAMTS13 und Lebererkrankungen	20
3.3	Histamin	21
3.3.1	Struktur und Funktion.....	21
3.3.2	Histaminrezeptoren	22
3.3.2.1	Histaminrezeptor Subtyp 1 (H1).....	22
3.3.2.2	Histaminrezeptor Subtyp 2 (H2).....	22
3.3.2.3	Histaminrezeptor Subtyp 3 (H3).....	23
3.3.2.4	Histaminrezeptor Subtyp 4 (H4).....	23
3.3.3	Die Rolle des Histamins bei Lebererkrankungen	23
4	Ziele der Arbeit	25
5	Methodik.....	27
5.1	Materialien.....	27
	Reagenzien	27
	Antikörper	28
	Geräte und sonstige Materialien.....	28

5.2	Zellkultur.....	29
5.2.1	Zellkulturen.....	29
5.2.2	Zellzählung und Vitalitätstestung mit Trypanblau	32
5.2.3	Kokultur.....	32
5.3	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB).....	33
5.4	Durchflusszytometrie.....	37
5.5	ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay).....	38
5.5.1	ADAMTS13-Nachweis im Zellkulturüberstand	38
5.5.2	ADAMTS13-Nachweis in/auf der Zelle (Zell-ELISA)	39
5.6	Histaminstimulation	39
5.6.1	Überprüfung der Spezifität der Histaminwirkung.....	39
5.6.2	Zellvitalitätstestung mit Alamar Blue	41
5.7	Nachweis von ADAMTS13 in der Nabelschnur	42
5.8	Statistische Auswertung	44
5.8.1	Standardabweichung und Student's t-Test	44
5.8.2	Ausreißereliminierung nach dem Henning Test	44
6	Ergebnisse.....	45
6.1	Nachweis von ADAMTS13	45
6.1.1	LSAB.....	45
6.1.2	Durchflusszytometrie.....	47
6.1.3	Messung von ADAMTS13 im Zellkulturüberstand.....	48
6.1.4	Kokultur.....	50
6.1.5	Einfluss von TGF- β 1 auf den ADAMTS13-Gehalt.....	50
6.2	Nachweis von α -Smooth-Muscle-Actin.....	52
6.2.1	LSAB.....	52
6.2.2	Durchflusszytometrie.....	53
6.2.3	Einfluss von TGF- β 1 auf den Aktin Gehalt der Zelllinie LX-2	54
6.3	Histaminstimulation	55
6.3.1	ADAMTS13-Nachweis im ELISA nach Histaminstimulation.....	55
6.3.2	Auswirkungen von Histamin auf die Zellvitalität	57
6.3.3	Histaminrezeptoren H1, H2, H3, H4 Nachweis mit LSAB	57
6.4	Prüfung der Spezifität der Histaminstimulation.....	58
6.4.1	Antagonisierung der Histaminwirkung durch Histaminantagonisten....	58
6.4.2	Einsatz von selektiven H1 und H2 Histaminagonisten	61
6.4.3	Hemmung der Signalkaskade durch spezifische Inhibitoren.....	62

6.5	Nabelschnurstimulation als Annäherung an ein <i>In vivo</i> -Modell	63
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
7	Diskussion	67
7.1	Klinischer Ausblick	76
8	Schlussfolgerungen	77
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	78
10	Anhang Messwerte der Experimente.....	76
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

II.) Abbildungsverzeichnis

Kapitel 3 Grundlagen

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des vWF.....	12
Abbildung 3.2: Schematische Struktur von ADAMTS13.....	15
Abbildung 3.3: Pathogenese der TTP.....	19

Kapitel 5 Methodik

Abbildung 5.1: Zellkulturlinie Hep-G2, Vergrößerung x 200	30
Abbildung 5.2: Zellkulturlinie LX-2, Vergrößerung x 200	30
Abbildung 5.3: Zellkulturlinie EA.hy926, Vergrößerung x 200.....	31
Abbildung 5.4: Zellkulturlinie OVCAR-3, Vergrößerung x 200	23
Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Methode Kokultur	33
Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der LSAB-Methode	34
Abbildung 5.7: Durchführung des Nabelschnurperfusionsexperimentes	43

Kapitel 6 Ergebnisse

Abbildung 6.1: LX-2 - ADAMTS13 Nachweis im LSAB.....	45
Abbildung 6.2: Hep-G2 - ADAMTS13 Nachweis im LSAB.....	46
Abbildung 6.3: EA.hy926 - ADAMTS13 Nachweis im LSAB.....	46
Abbildung 6.4: OVCAR-3 - ADAMTS13 Nachweis im LSAB	46
Abbildung 6.5: Bestimmung der intrazellulären ADAMTS13-Konzentration (FACS)	47
Abbildung 6.6: ADAMTS13-Basisekretion	48
Abbildung 6.7: ADAMTS13-Sekretionsrate.....	49
Abbildung 6.8: ADAMTS13-Antigengehalt nach Kokultivierung der Zelllinien	50
Abbildung 6.9: Einfluss von TGF- β 1 auf die ADAMTS13-Antigengehalt	51
Abbildung 6.10: LX-2 α -Smooth-Muscle-Actin Nachweis (LSAB).....	52
Abbildung 6.11: Bestimmung von α -Smooth-Muscle-Actin bei LX-2 (FACS).....	53
Abbildung 6.12: Einfluss von TGF- β 1 auf α -Smooth-Muscle-Actin.....	54
Abbildung 6.13: ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin der Zelllinie LX-2.....	55
Abbildung 6.14: ADAMTS13-Antigenkonzentration nach Histaminstimulation	56
Abbildung 6.15: Antagonisierung von H1 mit Dimetinden.....	58
Abbildung 6.16: Antagonisierung von H1 mit Diphenhydramin.....	59
Abbildung 6.17: Antagonisierung von H2 mit Ranitidin.....	59

Abbildung 6.18: Antagonisierung von H3 und H4 mit Thioperamid	60
Abbildung 6.19: ADAMTS13 und Histaminagonisten	61
Abbildung 6.20: ADAMTS13 und Signalkaskadeninhibitoren	62
Abbildung 6.21: Nabelschnurperfusionsexperiment	63

Kapitel 7 Diskussion

Abbildung 7.1: Hypothese der Regulation der ADAMTS13-Synthese mit TGF- β 1 ...	70
Abbildung 7.2: Transaktivierung der Tyrosinkinasen PDGFR und Met.....	74
Abbildung 7.3: Histamin, ADAMTS13 und vWF Sekretion	75

III.) Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS13	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL4	Tetrachlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMNA	Dimethylnitrosamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	fetales Kälber Serum
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
H1	Histaminrezeptor der Subklasse 1 (äquivalent zu H2, H3 und H4)
HCl	Salzsäure
HSC	hepatic stellate cell
HWZ	Halbwertszeit
IFN- γ	Interferon- γ
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
NaCl	Natriumchlorid
PBS	phosphate buffered saline
SK	Subklasse (Antikörper)
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTP	thrombotisch thrombozytopenische Purpura
VWF	von-Willebrand-Faktor

1 Zusammenfassung

ADAMTS13, eine Zink-Metalloprotease, spaltet den von-Willebrand-Faktor, dessen Funktion eine Vernetzung der Thrombozyten nach Gefäßverletzung umfasst. Dieser Vorgang ist Voraussetzung zur Aufrechterhaltung des Blutstromes und der Wundheilung nach Verletzung. Ein quantitativer bzw. qualitativer Mangel des Enzyms führt zum Krankheitsbild der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura mit den fünf klassischen Symptomen Niereninsuffizienz, neurologische Störungen, Fieber, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie.

Das Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung der Expression und Sekretion der von-Willebrand-Faktor-spaltenden Protease ADAMTS13 an zwei verschiedenen hepatischen Zelllinien und einer Endothelzelllinie sowie Untersuchungen zur Beeinflussung der Sekretion durch die Mediatoren Histamin und TGF- β 1. Die Auswahl dieser Zelllinien erfolgte aufgrund der Tatsache, dass die Leber und das Endothel aktuell als Hauptorte der ADAMTS13-Synthese identifiziert wurden. Da hepatische Stellatzellen eine Schlüsselrolle in der ADAMTS13-Synthese innehaben, ist ergänzend der Stellenwert der hepatischen Parenchymzellen näher zu betrachten. Dabei konnte für die beiden hepatischen Zelllinien Hep-G2 und LX-2 eine hohe intrazelluläre ADAMTS13-Konzentration nachgewiesen werden. Dies erfolgte einerseits durch verschiedene Messmethoden (LSAB, Durchflusszytometrie) und andererseits mithilfe unterschiedlicher anti-ADAMTS13 Antikörper. Neben der Stellatzelllinie LX-2 konnte auch die Parenchymzelllinie Hep-G2 als Ort einer hohen ADAMTS13-Synthese identifiziert werden. Es zeigte sich dabei, dass beide Zelllinien kontinuierlich ohne externe Stimuli ADAMTS13 in den Zellkulturüberstand sekretieren. Weiterhin wurden die Auswirkungen von Histamin und TGF- β 1 auf die ADAMTS13-Sekretion der Zellkulturen untersucht, da TGF- β 1 als potentes profibrotisches Zytokin die Umwandlung von hepatischen Sternzellen induziert und Histamin als Stimulanz der endothelialen von-Willebrand-Faktor Sekretion und starker inflammatorischer Reiz bekannt ist. Die Zellkulturüberstände der stimulierten und unstimulierten Zellen wurden im ELISA bestimmt. Nach TGF- β 1 Inkubation konnte eine erhöhte Antigenkonzentration von ADAMTS13 im Zell-ELISA der Parenchymzelllinie Hep-G2 und eine erhöhte α -Smooth-Muscle-Actin-Antigenkonzentration der Zelllinie LX-2 gezeigt werden. α -Smooth-Muscle-Actin dient als Marker der Aktivierung der hepatischen Sternzellen im Rahmen der

Transformation zum Myofibroblasten. Dies führt zu der Hypothese, dass TGF- β 1 an der Regulation der ADAMTS13 Synthese zwischen den Parenchymzellen und den Stellatzellen der Leber beteiligt ist. Es konnte keine signifikante Beeinflussung der ADAMTS13 Konzentration nach Kokultivierung der Zelllinien Hep-G2 und LX-2 nachgewiesen werden.

Nach Zugabe des inflammatorischen Mediators Histamin konnte ein erhöhtes ADAMTS13-Signal im Zellkulturüberstand an beiden hepatischen Zelllinien gemessen werden. Die Versuche zur Charakterisierung der histaminvermittelten ADAMTS13-Sekretion heben die besondere Rolle des Histaminrezeptorsubtypes H1 hervor. Daraufhin deutet zum einen die Möglichkeit der ADAMTS13-Signalinhibierung nach vorheriger Inkubation mit den H1-Antagonisten Dimetinden und Diphenhydramin und zum anderen eine signifikante Erhöhung des ADAMTS13-Signals nach Zugabe des selektiven H1-Agonisten Methylhistaprodifen. Mit dem Einsatz verschiedener Signalkaskaden-Inhibitoren sollte die histaminvermittelte gesteigerte ADAMTS13-Abgabe über einen G-Protein gekoppelten spezifischen Signalweg bestätigt werden. Die Ergebnisse der Experimente zur Identifizierung einer bestimmten Signalkaskade lassen eine G-Protein-Rezeptor gekoppelte Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und Met mittels Histamin vermuten.

Als Annäherung an ein *In vivo*-Modell wurden in einem Perfusionsexperiment sieben Nabelschnurvenen mit Histamin stimuliert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des ADAMTS13-Signals nach Stimulation bei ca. der Hälfte der Nabelschnüre (n=3) im Vergleich zur Kontrolle.

Es ist denkbar, dass die histaminvermittelte ADAMTS13-Sekretion ein natürlicher Schutzmechanismus gegen die vermehrt anfallenden vWF-Multimere im Rahmen einer Entzündung darstellt.

Zusammenfassend konnten grundlegende Erkenntnisse zur ADAMTS13-Expression und -sekretion an den Leberzelllinien LX-2 und Hep-G2 gewonnen werden. Die beeinflussenden Faktoren wie TGF- β 1 und Histamin deuten auf einen komplexen Regulationsmechanismus der ADAMTS13-Synthese in der Leber hin.

2 Einleitung

Dr. Eli Moschcowitz beschrieb 1924 erstmalig ein bisher unbekanntes Krankheitsbild bei einer 16-jährigen Patientin mit Petechien, Anämie, Lähmungserscheinungen und Proteinurie infolge einer Nierenbeteiligung, welches schließlich zum Tod der Erkrankten führte (Moschcowitz 1924). In der Autopsie fand Moschcowitz zahlreiche hyaline Thromben in den terminalen Arteriolen der Endorgane wie Herz und Nieren. Fast 60 Jahre später entdeckte Moake bei Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura (TTP) extrem lange vWF-Multimere im Blut und stellte damit den Zusammenhang zwischen der Mikroangiopathie TTP und dem von-Willebrand-Faktor her (Moake et al. 1982). 1986 konnte erstmals eine proteolytische Spaltung des vWF im Plasma in 140 und 176 kDa-Fragmente gezeigt werden (Zimmerman et al. 1986). Zeitgleich identifizierten 1996 Furlan et al. und Tsai et al. eine Metalloprotease aus dem menschlichen Plasma, welche den vWF zwischen den Aminosäuren Tyr1605 und Met1606 spaltet. Mithilfe des Immunoblotting-Verfahrens konnte der Nachweis der vWF-Proteaseaktivität unter hohen Scherkräften und in Anwesenheit von Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff *in vitro* erbracht werden (Furlan et al. 1996; Tsai 1996). Ebenfalls wiesen Furlan et al. und Tsai et al. 1998 unabhängig voneinander nach, dass bei Patienten mit akuter TTP ein Mangel an der vWF-spaltenden Protease vorliegt (Furlan et al. 1998; Tsai et al. 1998). 2001 konnten Levy et al. bei vier Familien mit angeborener TTP das Gen lokalisieren, welches für die Erkrankung verantwortlich ist (Levy et al. 2001). Dieses Gen codiert für ein neues Mitglied der ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) Familie und wurde als ADAMTS13 bezeichnet. Gerritsen et al. und Fujikawa et al. bestätigten mit der Reinigung und Sequenzierung des Enzyms ADAMTS13 im Jahr 2001 dessen Funktion einer vWF-spaltenden Protease (Fujikawa et al. 2001; Gerritsen et al. 2001).

3 Grundlagen

3.1 Von-Willebrand-Faktor

3.1.1 Struktur

Das Translationsprodukt umfasst ein Signalpeptid, ein Propeptid und das tatsächliche von-Willebrand-Faktor-Makropeptid, welches aus 2050 Aminosäuren besteht. Die Bildung von pro-vWF-Dimeren erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den C-terminalen Enden zweier Pro-vWF-Moleküle (Dent et al. 1991). Im Golgiapparat werden diese Dimere durch Ausbildung weiterer Disulfidbrücken an den N-terminalen Enden polymerisiert. So entstehen Polymere gleicher Untereinheiten, die so genannten vWF-Multimere. Der vWF besteht in seiner multimeren Form aus bis zu 40 Subeinheiten (bis zu 20000 kDa) und ist damit das längste Plasmaprotein im menschlichen Körper. Der vWF enthält mehrere funktionelle Domänen, die bestimmte Bindungsstellen besitzen. Zu diesen Bindungsstellen gehören Rezeptoren für den Faktor VIII, Kollagen, Heparin und verschiedene Thrombozytenglykoproteine (Ruggeri 2001; Wagner 1990).

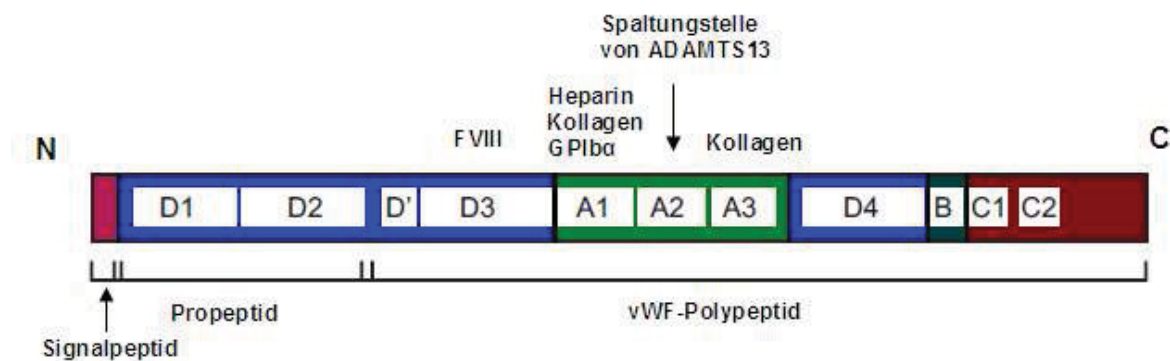


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des vWF, modifiziert nach Ruggeri 2001.

3.1.2 Synthese

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiertes Glykoprotein, welches im Plasma zirkuliert und einen sehr wichtigen Bestandteil der primären und sekundären Hämostase darstellt (Jaffe 1982, Sporn et al. 1985). Die Speicherung des vWF erfolgt in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und in den Alpha-Granula der Thrombozyten (Wagner 1990). Die

Abgabe des vWF erfolgt zum einen konstitutiv abluminal in die extrazelluläre Matrix und luminal in das Plasma und zum anderen über einen regulierten Signalweg. Dieser kann durch eine Stimulation, wie z.B. eine Gefäßverletzung und die damit verbundene Freisetzung von Plasmafaktoren wie Thrombin angeregt werden (Wagner 1990). Dabei beobachtet man einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes, was durch die Gabe von Histamin, Fibrin oder Thrombin auch *in vitro* bestätigt werden konnte (Hamilton und Sims 1987). Die histaminvermittelte Abgabe des vWF erfolgt dabei über den Histaminrezeptor Subtyp 1 (Hamilton und Sims 1987). Bei einer Länge von bis zu 20000 kDa bedarf es einer schnellen Spaltung des sehr großen Proteins in mehrere Multimere geringerer Größe mittels der von-Willebrand-Faktor-spaltenden Protease ADAMTS13, um eine spontane Formation von Thrombozytenaggregaten zu verhindern.

3.1.3 Regulation und Funktion in der Hämostase

Vereinfacht betrachtet ist die Hauptaufgabe des vWF, zirkulierende Thrombozyten am Ort der Verletzung zu fixieren, welche für die primäre Blutgerinnung bei einer Verletzung benötigt werden. Am intakten Endothel erfolgt keine Bindung und Aktivierung von Thrombozyten. Zeigt das Gefäßendothel jedoch eine Verletzung, kommt es zur Freilegung extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Fibronektin oder Laminin, für die der von-Willebrand-Faktor Rezeptoren besitzt, die es ihm ermöglichen an das verletzte Endothel zu binden und die Thrombozytenaggregation einzuleiten. Analysen des vWF-Moleküls haben gezeigt, dass die Multimere im Plasma in einer kompakten, globulären Form vorliegen und unter Einwirkung hoher Scherkräfte entfaltet werden (Siedlecki et al. 1996). Dabei kommt es zu einer Verlagerung der Bindungs epitope für Kollagen und der Thrombozytenrezeptoren an die Proteinoberfläche, so dass eine Bindung der Liganden ermöglicht wird. Die Exposition des vWF gegenüber den Scherkräften des Blutflusses führt zur Entfaltung des vWF und ermöglicht damit eine Spaltung des Moleküls durch ADAMTS13 aufgrund der freigelegten A2 Domäne. In Abwesenheit von ADAMTS13 führen die Scherkräfte zu einer erhöhten Bindungskapazität des vWF gegenüber den Thrombozyten und so zu einer gesteigerten Gerinnung (Tsai 2003). Der von-Willebrand-Faktor stellt dabei eine Verbindung zwischen dem Subendothel und seinem Rezeptor auf den Thrombozyten, dem GPIIb/IIIa, her. Die Aktivität und Affinität des vWF zeigt dabei eine Abhängigkeit von der Multimer-Größe (Federici et

al. 1989). Das heißt, je größer die Multimere, umso mehr Bindungsstellen ermöglichen eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix und den Thrombozyten. Momentan werden zwei Wege der Regulation diskutiert. Erstens, die Reduktion der Disulfid-Bindungen durch Thrombospondin (Pimanda et al. 2002; Xie et al. 2001) und zweitens, die proteolytische Spaltung des vWF durch die bereits erwähnte Zink-Metalloprotease (syn. vWF-spaltende Protease, ADAMTS13) (Furlan et al. 1996; Tsai 1996). Die Degradation des vWF durch ADAMTS13 soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Eine weitere Aufgabe des von-Willebrand-Faktors ist der Schutz des Faktors VIII (Antihämophiles Globulin A) vor dem vorzeitigen, proteolytischen Abbau durch zirkulierende Proteasen wie z.B. Protein C und Faktor Xa (Weiss et al. 1977). Der von-Willebrand-Faktor und Faktor VIII zirkulieren zusammen im Blutplasma als Komplex. Die Plasmakonzentration des vWF ist dabei um ein Vielfaches höher als die Plasmakonzentration des Faktor VIII (Wagner 1990).

3.1.4 Von-Willebrand-Faktor-assoziierte Krankheiten

Der Anzahl und Größe der von-Willebrand-Faktor-Multimere ist ein eng gesteckter Rahmen im Ablauf der physiologischen Blutgerinnung gesetzt. Dies wird durch die Existenz der vWF-assoziierten Krankheiten demonstriert. Sowohl ein Mangel, als auch ein Überschuss der Multimere führt zu Störungen der Hämostase.

Ein quantitativer oder qualitativer Mangel des von-Willebrand-Faktors führt zum Krankheitsbild des Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom. Es ist die häufigste vererbte hämorrhagische Diathese mit einer Prävalenz von ca. 1%. Die erhöhte Blutungsneigung äußert sich durch die Ausbildung flächiger Hämatome, rezidivierendem Nasenbluten, lang anhaltender Menstruationsblutungen sowie verlängerten und ausgiebigen Blutungen auch nach kleinen chirurgischen Eingriffen (Castaman et al. 2003). Die klinische Symptomatik resultiert zum einen aus der gestörten Thrombozytenaggregation und zum anderen aus dem beschleunigten Abbau des Faktors VIII, da die protektiven Eigenschaften des von-Willebrand-Faktors fehlen. So führt ein Mangel des von-Willebrand-Faktors auch zu einer quantitativen Verminderung des Faktors VIII bzw. zur Verkürzung dessen Halbwertszeit und somit zu einer der Hämophilie A ähnlichen Symptomatik.

Die Unterteilung des Von-Willebrand-Syndroms kann in drei Hauptgruppen erfolgen. Der Typ 1 ist mit ca. 80% der häufigste Subtyp und durch einen meist milden quantitativen Defekt gekennzeichnet. Typ 3 ist durch ein völliges Fehlen des von-

Willebrand-Faktors charakterisiert und geht somit mit einer schweren hämorrhagischen Symptomatik einher. Der Typ 2 hat ein sehr heterogenes Erscheinungsbild, da bei diesem Subtyp sämtliche qualitativen Defekte eingeschlossen sind (Furlan 1996).

Das Krankheitsbild der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) verdeutlicht die mangelhafte Spaltung des von-Willebrand-Faktors und die daraus resultierenden großen Multimere. Diese Erkrankung führt zu einer spontanen Thrombenbildung und wird durch einen Defekt der vWF-spaltenden Protease ADAMTS13 ausgelöst. Die Pathogenese und die klinischen Symptome werden in einem der folgenden Kapitel ausführlich betrachtet.

3.2 Von-Willebrand-Faktor-spaltende Protease – ADAMTS13

3.2.1 Struktur

Das ADAMTS13-Gen ist auf dem Chromosom 9q34 lokalisiert. Die cDNA, die für ein Protein mit 1427 Aminosäuren kodiert, umfasst 4597 Nucleotide. Das Translationsprodukt enthält ein Signalpeptid (S), ein Propeptid (P), eine Metalloproteasedomäne (M), eine Disintegrin ähnliche Domäne (D), eine Thrombospondin-1-Domäne, eine Cystein-reiche Domäne, einen ADAMTS-Spacer, sieben weitere Thrombospondin-1-Domänen und abschließend zwei CUB-Domänen. Aufgrund dieser Struktur erfolgte die Einordnung als Mitglied der ADAMTS-Metalloproteasen (Soejima et al. 2001; Zheng et al. 2001).

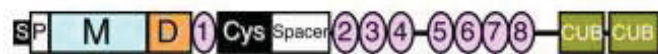


Abbildung 3.2: Schematische Struktur ADAMTS13, nach Sadler E.J. 2009

3.2.2 Synthese und Sekretion

Die Lokalisation der Synthese von ADAMTS13 war und ist Gegenstand der aktuellen Forschung und scheint nicht auf nur ein bestimmtes Organ bzw. Gewebe begrenzt zu sein. Zusammenfassend betrachtet erfolgte bisher der Nachweis der aktiven vWF-spaltenden Protease in der Leber (Cal et al. 2002; Levy et al. 2001; Zheng et al. 2001), der Niere (Manea et al. 2007; Manea et al. 2009), den Thrombozyten (Suzuki et al. 2004) und den Endothelzellen (Turner et al. 2009; Turner et al. 2006). Darüber

hinaus konnte der RNA-Nachweis auch in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Lunge, Milz, Skelettmuskulatur (Plaimauer et al. 2002) und Ovar und Pankreas erbracht werden (Levy et al. 2001). Die Funktion der Expression in diesen Organen ist noch weitgehend ungeklärt.

Die Untersuchung verschiedener hepatischer Zellkulturen zeigt eine intrazelluläre Speicherung des Enzyms bis zum Sekretionsreiz, wobei aktuell noch keine Zuordnung zu einer bestimmten Zellorganelle oder eine Speicherung in bestimmten Vesikeln getroffen werden kann (Geetha et al. 2009).

3.2.3 ADAMTS13-Synthese in der Leber

Die Untersuchungen zur Gen-Expression von ADAMTS13 deuten darauf hin, dass die Protease in der Leber stärker als in anderen Geweben exprimiert wird und die Leber damit eine Hauptquelle des Enzyms darstellt. Bei verschiedenen Untersuchungen wurden die hepatischen Stellatzellen als die hepatischen Zellen mit der höchsten ADAMTS13-Exprimierung identifiziert (Uemura et al. 2005; Zhou et al. 2005). Bei dieser Zellart handelt es sich um perisinusoidal lokalisierte Zellen, die visuell durch sternförmige, dendritische Ausläufer charakterisiert sind und durch ihren Retinolgehalt eine Autofluoreszenz aufweisen. Zu den weiteren Funktionen zählen die Regeneration und Beteiligung an Umbauprozessen nach Leberschädigung, der Retinoid-Metabolismus, die Beteiligung an der Immunregulation und die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Friedman 2008).

3.2.4 ADAMTS13-Synthese in Endothelzellen

Eine weitere Quelle der ADAMTS13-Sekretion wurde in arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur (Human umbilical vein endothelial cells - HUVECS) und weiteren Endothelzelllinien gefunden (Turner et al. 2006, Shang et al. 2006). Dabei zeigte die intrazelluläre Verteilung der Protease einen deutlichen Unterschied zur Lokalisation des von-Willebrand-Faktors in den Weibel-Palade-Körperchen, was auf eine separate Speicherung hinweist (Shang et al. 2006). Das ADAMTS13-Antigen wurde in den venösen Endothelzellen der Nabelschnur in den Zellorganellen Endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat nachgewiesen. Die Abgabe erfolgt langsam und kontinuierlich und lässt sich nicht mit Histamin stimulieren. Dies spricht gegen eine intrazelluläre Speicherung in Vesikeln oder Speicherorganellen (Turner et al. 2009). Der mRNA-Level des von-Willebrand-Faktors ist über 100fach höher als der Level der ADAMTS13-mRNA in den Endothelzellen, sodass man eine eher

geringe Sekretion vermuten kann (Turner et al. 2009). Berücksichtigt man jedoch, dass der Anteil der hepatischen Stellatzellen an den gesamthepatischen Zellen unter 10% beträgt, liegt die Überlegung nahe, dass die Vielzahl der im Körper verteilten Endothelzellen dennoch einen bedeutenden Beitrag für die ADAMTS13-Sekretion leisten.

3.2.5 ADAMTS13-Sekretion in der Niere

Da die Niere eines der Zielorgane der TTP ist, erfolgten Untersuchungen zur renalen ADAMTS13-Expression und -Sekretion. Es zeigte sich ein positiver Nachweis in den Glomeruli des renalen Kortex und in den Tubulus-Zellen. Mithilfe des Elektronenmikroskops konkretisierte man die renale ADAMTS13-Lokalisation in den Podozyten, dem Endothel und der glomerulären Basalmembran der Niere. Die Funktion der vWF-spaltenden Protease könnte eine Protektion der renalen Gefäße unter hoher Scherstress-Einwirkung im Glomerulus umfassen (Manea et al. 2007; Manea et al. 2009).

3.2.6 Funktion

ADAMTS13 spaltet den von-Willebrand-Faktor im Bereich der A2-Domäne spezifisch zwischen den Aminosäuren Tyrosin und Methionin in Multimere unterschiedlicher Größe mit einem geringeren Molekulargewicht. (Furlan et al. 1996; Tsai 1996). Dieser Vorgang ist die Voraussetzung zur Vermeidung der hochmolekularen vWF-Multimere, und somit zur Aufrechterhaltung des Blutflusses. Die Induktion einer Hyperaggregation der Thrombozyten führt zu den TTP-charakteristischen hyalinen Thromben mit einem hohen Gehalt an vWF und einem niedrigen Gehalt an Fibrin (Hosler et al. 2003). Der von-Willebrand-Faktor ist das bisher einzig bekannte Substrat des Enzyms (Furlan et al. 1996). Die Plasmakonzentration der Protease liegt bei ca. 1µg/ml. Das Enzym zeichnet sich durch eine sehr lange Halbwertszeit aus. *In vitro* beträgt die HWZ etwa eine Woche und *in vivo* 2-3 Tage (Furlan et al. 1999; Gerritsen et al. 2001).

Eine weitere Hypothese diskutiert eine proteolytische Funktion des Enzyms in der Modulation, Formation und Regeneration der Leber nach Leberzellschädigung und der Entwicklung einer Leberzirrhose. Diese Annahme fundiert auf der Beobachtung eines starken Anstieges des ADAMTS13-Antigengehaltes und der ADAMTS13-Aktivität nach Behandlung primärer hepatischer Stellatzellen mit Tetrachlormethan (CCl₄) und einem äquivalenten Rattenmodell mit CCl₄. Diese Substanz wird im

Tiermodell zur Simulation einer akuten Leberschädigung verwendet (Lee et al. 2003, Niiya et al. 2006).

3.2.7 ADAMTS13 und die thrombotische thrombozytopenische Purpura

Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) gehört zur Gruppe der thrombotischen Mikroangiopathien und wurde 1924 erstmals von Moschcowitz beschrieben (Moschcowitz 1924). Das klinische Bild wird dabei von folgenden fünf klassischen Symptomen bestimmt: Niereninsuffizienz, neurologische Ausfälle, Fieber, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie (Murrin et al. 2006.) Als Zeichen der Hämolyse ist die Laktatdehydrogenase stark erhöht und das Haptoglobin vermindert. Im Blutaussstrich findet man zerstörte Erythrozyten, so genannte Fragmentozyten oder Schistozyten.

Die Ursache dieser unkontrollierten Thrombosierung kleiner Gefäße ist eine verminderte Aktivität bzw. ein Mangel der von-Willebrand-Faktor-spaltenden Protease (Furlan et al. 1996; Levy et al. 2001; Tsai & Lian 1998). Dies hat zur Folge, dass der von-Willebrand-Faktor als überlanges Multimer im Plasma vorliegt und schon bei Scherkräften, wie sie unter normalen Bedingungen in kleinen Arteriolen und Kapillaren vorkommen, unspezifisch an das Endothel bindet. Daraus resultiert unabhängig von Endothelverletzungen eine Thrombozytenaggregation in der Mikrozirkulation mit nachfolgender Mikrothrombosierung und Ischämie der Zielorgane. Der erhöhte periphere Thrombozytenverbrauch verursacht die bereits erwähnte Thrombozytopenie, die zu petechialen Blutungen und einer Hämaturie, als Zeichen der sekundären Schädigung der Niere, führt. Aufgrund der hohen Strömungswiderstände und Scherkräfte kommt es an Orten der Mikrothrombosierung zu einer mechanischen Zerstörung der Erythrozyten und dies präsentiert sich klinisch als Coombs-negative, hämolytische Anämie.

Die Differenzierung der TTP kann ausgehend von der Pathophysiologie erfolgen. Man unterscheidet dabei die idiopathische TTP, die sekundäre TTP und die hereditäre TTP. Die Mehrzahl der Fälle ist in die Gruppe der idiopathischen TTP einzuordnen, bei der es zur Bildung von Autoantikörpern gegen die Protease ADAMTS13 kommt (Tsai & Lian 1998). Ursachen für das Auftreten einer sekundären TTP können Schwangerschaft, Knochenmarktransplantation, Medikamente, Infektionen (z.B. HIV) und Malignome sein. Die hereditäre TTP (Upshaw-Schulman-Syndrom) wird durch einen Defekt im ADAMTS13-Gen ausgelöst, welches auf dem Chromosom 9q34 lokalisiert ist. Dabei existiert eine Vielzahl unterschiedlicher

Mutationen, welche als gemeinsames Merkmal eine stark verminderte ADAMTS13-Aktivität im Plasma haben (Crowther et al. 2008).

Bei gesunden, erwachsenen Probanden fand man eine Streuung der Aktivität von ADAMTS13 von 40% bis 170%. Bei Neugeborenen erreichte das Minimum der Aktivität der Protease Werte bis zu 25% (Mannucci et al. 2001). Eine ADAMTS13-Aktivität < 5% geht fast immer mit klinischen Symptomen einher und ist spezifisch für das Vorliegen einer thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (Bianchi et al. 2002).

Eine reduzierte ADAMTS13-Aktivität ist nicht zwingend aufgrund einer TTP verursacht. Eine verminderte ADAMTS13-Aktivität wird auch in anderen physiologischen Situationen wie z.B. bei Neugeborenen, Schwangeren im 2. und 3. Trimenon und älteren Menschen ab 65 Jahren beobachtet. Weitere pathologische Zustände, die auch zu einer verminderten ADAMTS13-Aktivität führen können, sind Urämie, Leberzirrhose, Inflammation oder die postoperative Phase (Mannucci et al. 2001), maligne Erkrankungen (Oleksowicz et al. 1999), systemischer Lupus erythematodes, idiopathische Thrombozytopenie und Verbrauchskoagulopathie (Moore et al. 2001) sowie das hämolytisch-urämische Syndrom (Remuzzi et al. 2002) und Knochenmarktransplantation (Kentouche et al. 2006). Dies soll betonen, dass ein ADAMTS13-Mangel nicht spezifisch für das Vorliegen einer TTP ist.

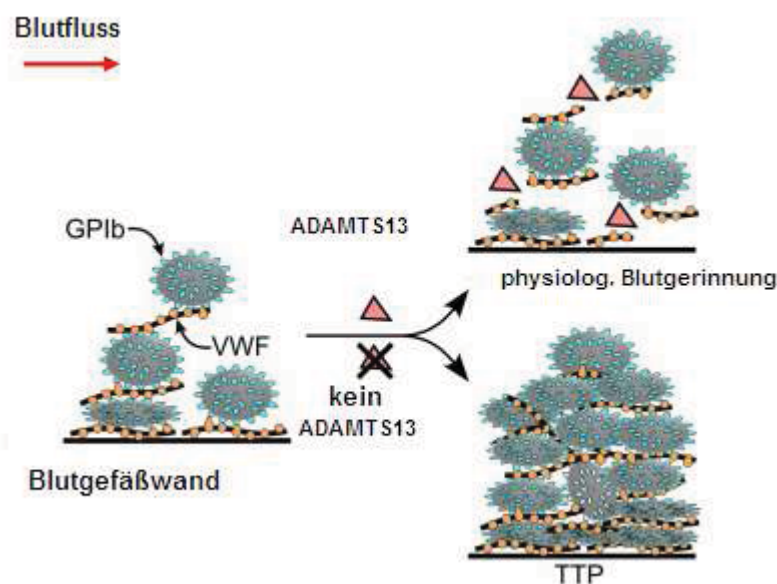


Abbildung 3.3: Pathogenese der TTP, nach Sadler E.J. 2009

Ein weiterer pathophysiologischer Ansatz beschäftigt sich mit der Rolle des massiv anfallenden Hämoglobins im Rahmen der Hämolyse. Das extrazelluläre Hämoglobin inhibiert zum einen Stickstoffmonoxid (NO), welches eine wichtige Funktion bei der Regulation des Gefäßtonus hat, und zum anderen wurde ein direkter inhibitorischer Effekt des extrazellulären Hämoglobins gegen ADAMTS13 nachgewiesen. Dies könnte ein Ansatz für die Erklärung unspezifischer Symptome der TTP wie Abdominalschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sein (Thachil 2007).

3.2.8 ADAMTS13 und Inflammation

Als Entzündung (Inflammation) bezeichnet man eine regulierte Abwehrreaktion des Körpers auf exogene Einwirkungen (Krankheitserreger, Trauma). Bestehend aus einem humoralen und zellulären Anteil ist sie lebensnotwendig zur Erhaltung und Regeneration des menschlichen Organismus nach Verletzungen. Man unterscheidet dabei die lokale Entzündung von der systemischen Entzündung, wobei letztere sich zu einem lebensbedrohenden Krankheitsbild (Sepsis) entwickeln kann. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-1 oder IL-6. Es gibt Hinweise, dass diese Zytokine einen inhibitorischen Effekt auf die von-Willebrand-Faktor-spaltende Protease ausüben, da bei Patienten mit SIRS (Systemic Inflammatory Response Sndrome) eine verminderte ADAMTS13-Aktivität gefunden wurde. Diese These wurde mit einem Experiment an hepatischen Stellatzellen und Endothelzellen bestätigt, wobei eine signifikante Inhibierung der Synthese und Sekretion von ADAMTS13 verursacht durch IFN- γ , IL-4 und TNF- α nachgewiesen werden konnte (Cao et al. 2008). Bei dem Vergleich von gesunden Probanden und Sepsis-Patienten konnte ebenfalls eine erniedrigte ADAMTS13-Aktivität im Rahmen der systemischen Inflammation nachgewiesen werden (Claus et al. 2009).

3.2.9 ADAMTS13 und Lebererkrankungen

Die Umwandlung von hepatischen Geweben in minderwertiges Bindegewebe (Fibrose) ist eine Antwort auf eine Leberzellschädigung unterschiedlicher Genese. Dabei kommt es zu einer massiven Vermehrung von extrazellulärer Matrix wie Kollagen und einer Verdrängung des normalen Leberparenchymgewebes. Eine Schlüsselrolle bei der Leberfibrose haben die hepatischen Stellatzellen, welche im Rahmen der Leberzellschädigung von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand übergehen. Dabei transformieren die Retinol-speichernden Zellen in einen

Myofibroblasten ähnlichen Zelltyp (Friedman 2008). In diesem Status kommt es zur Ausschüttung einer Vielzahl profibrotischer und proliferative Zytokine wie z.B. TGF- β 1. Die Stellatzellen sind die Hauptquelle für die Vermehrung der extrazellulären Matrix (Bedossa et al. 1995; Friedman 1997). Ein Marker für die Aktivierung ist ein vermehrter Gehalt von α -Smooth-Muscle-Actin (Xu et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass ein verminderter Sauerstoffgehalt (Hypoxie, 1% O₂) zu einer Aktivierung der hepatischen Stellatzellen führt (Shi et al. 2007). Sauerstoffmangel ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese akuter und chronischer Leberzellschädigung. Bringt man nun die Tatsache, dass die hepatische Stellatzelle als Hauptquelle der ADAMTS13-Produktion identifiziert wurde in diesen Zusammenhang, stellt sich die Frage, welche Auswirkung die Transformation der hepatischen Stellatzellen auf die ADAMTS13-Synthese hat. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Reduktion der ADAMTS13-Aktivität im Plasma von Ratten kam, welche mit Dimethylnitrosamin (DMN), welches spezifisch Stellatzellen schädigt, behandelt wurden (Kume et al. 2007). Darüber hinaus konnte auch bei Patienten mit Leberzirrhose eine verminderte ADAMTS13-Aktivität nachgewiesen werden (Uemura et al. 2008). Welche Rolle dabei die Schädigung der Leberparenchymzellen spielt, ist noch weitgehend unklar.

3.3 Histamin

3.3.1 Struktur und Funktion

Histamin ist ein biogenes Amin, welches im menschlichen Organismus eine Schlüsselrolle als Gewebehormon und Neurotransmitter erfüllt. Die Bildung erfolgt durch Decarboxylierung der Aminosäure Histidin in Mastzellen, basophilen Granulozyten, Nervenzellen, Zellen der Bronchial- und Magenschleimhaut und Epidermiszellen. Die Speicherung findet gebunden an Heparin in Vesikeln statt. Die Freisetzung aus diesen Vesikeln resultiert zum einen aus IgE-vermittelten allergischen Reaktionen vom Soforttyp oder zum anderen aus einer Aktivierung mittels Komplementfaktoren. Darüber hinaus können auch Medikamente zu einer Histaminfreisetzung führen wie z.B. Narkosemedikamente, Muskelrelaxantien, Plasmaexpander oder Kontrastmittel (Moss et al. 1983). Histamin vermittelt seine Wirkung auf molekularer Ebene über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Hough 2001), wobei nach aktuellem Stand der Forschung vier Subtypen (H1 bis H4) der Histaminrezeptoren bekannt sind (Parsons et al. 2006).

3.3.2 Histaminrezeptoren

3.3.2.1 Histaminrezeptor Subtyp 1 (H1)

Die Stimulation des H1-Rezeptors führt zu einer G-Protein-gekoppelten Aktivierung der Phospholipase C, verbunden mit einer Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Der H1-Rezeptor wird in zahlreichen menschlichen Geweben exprimiert wie z.B. Gehirn, Nebennierenmark, Endothelzellen und Lymphozyten und der glatten Muskulatur der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und des kardiovaskulären Systems (Hill 1990). Die Wirkung des H1-Rezeptors präsentiert sich im Rahmen einer allergischen Reaktion mittels Schmerzen, Juckreiz, Kontraktion der glatten Muskulatur, der Bronchien und der großen Blutgefäße. Weiterhin führt die H1-Stimulation zur einer Vasodilatation der kleinen Blutgefäße, was sich klinisch als Rötung und Schwellung manifestiert. Im Zentralnervensystem ist Histamin über die Aktivierung von H1-Rezeptoren an der Auslösung des Erbrechens sowie der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt. Die Stimulation des H1-Rezeptors an Endothelzellen führt zu einer Sekretion des von-Willebrand-Faktors. Anhand der Histaminwirkung lässt sich die pharmakologische Anwendung von Histaminantagonisten herleiten. Die Hauptanwendung von H1-Antagonisten ist die therapeutische Behandlung allergischer Beschwerden, Schlafstörungen und als Antiemetika. Es existiert eine Weiterentwicklung der H1-Antagonisten mit dem Ziel, den sedierenden Effekt der ZNS-vermittelten Wirkung zu reduzieren. Diese werden im Gegensatz zu den frühen H1-Antagonisten (H1-Antihistaminika der 1. Generation) z.B. Diphenhydramin als Antihistaminika der 2. und 3. Generation bezeichnet (z.B. Dimetinden).

3.3.2.2 Histaminrezeptor Subtyp 2 (H2)

Die Anregung des H2-Rezeptors führt auf molekularer Ebene zu einer Aktivierung von Gs-Proteinen und als Folge dessen zu einer Aktivierung der Adenylcyclase. Dies hat eine Akkumulation an intrazellulären cAMP und einer Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} aus den Speichern zur Folge. Der H2-Rezeptor ist an der Regulation der Magensäureproduktion beteiligt, erhöht die Herzfrequenz und verfügt über einen relaxierenden Effekt auf glatte Muskelzellen von Blutgefäßen, dem Respirationstrakt und dem Uterus (Hill et al. 1997). Auch dem H2-Rezeptor wird eine bedeutende Rolle in der Generierung und Regulation der Entzündung zugeschrieben.

(Hill 1990). Anhand dieser Effekte ist die Therapieoption bei Magensäure-assoziierten Erkrankungen wie Gastritis und Ulcera nahe liegend.

3.3.2.3 Histaminrezeptor Subtyp 3 (H3)

Die Signaltransduktion des H3-Rezeptors führt zu einer Aktivierung von Gi-Proteinen und einer damit verbundenen Hemmung der Adenylcyclase. Der H3-Rezeptor ist dabei in eine Vielzahl zentralnervöser Vorgänge wie der Regulation des Hunger-Durst-Gefühls, des Tag-Nacht-Rhythmus oder der Körpertemperatur integriert. Der Rezeptor reguliert die Ausschüttung und Synthese des Histamins und die Ausschüttung anderer Neurotransmitter wie Serotonin, Noradrenalin und Dopamin (Schlicker et al. 1994a; Schlicker et al. 1994b). Eine weitere Expressierung des H3-Rezeptors konnte im peripheren Nervensystem des Gastrointestinaltrakt, des Respirationstraktes und des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden (Hill et al. 1997). Die pharmakologische Beeinflussung des H3-Rezeptors ist momentan Gegenstand verschiedener klinischer Studien (Parsons et al. 2006).

3.3.2.4 Histaminrezeptor Subtyp 4 (H4)

Der H4-Rezeptor wurde als letzter der bekannten Histaminrezeptoren im Jahr 2000 entdeckt (Oda et al. 2000). Er hat eine hohe Sequenzidentität mit dem H3-Subtyp. Die Hauptexpressierung des H4-Rezeptors ist aktuell in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks und peripheren Leukozyten beschrieben wurden. Die mRNA wurde darüber hinaus noch in Mastzellen, der Milz und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen. Der H4-Rezeptor ist beteiligt an der Chemotaxis der Leukozyten und Mastzellen und daher wird eine Rolle in der Regulation von akuten und chronischen Entzündungen diskutiert (Lim et al. 2006).

3.3.3 Die Rolle des Histamins bei Lebererkrankungen

Da in den durchgeführten Experimenten zwei Zelllinien hepatischer Herkunft auf ihr Verhalten nach Histaminexposition untersucht wurden, folgt nun eine Darstellung der Funktion des Histamins *in vivo*.

In der gesunden Leber liegen Mastzellen, als der Hauptspeicherort des Histamins, in einer geringen Anzahl permanent vor. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Mastzellen im Rahmen von akuten, chronischen und cholestatischen Lebererkrankungen, die mit einem fibrotischen Umbau der Leber einhergehen, ansteigt (Farrell et al. 1995). Bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis beobachtet

man erhöhte Histaminkonzentrationen im Blut (Ishii et al. 1978). Weiterhin kam es zu einem deutlichen Anstieg des Leberhistamingehaltes bei Ratten, welche mit dem Lebertoxin CCl_4 behandelt wurden (Umezu et al. 1985). In einer anderen Arbeit konnte mithilfe von Knock-out Mäusen für den H1 und H2 Rezeptor ein protektiver Effekt des Histamins im Rahmen einer LPS-bedingten (Lipopolysacccharid) Leberzellschädigung gezeigt werden. Die gleichzeitige Gabe von Histamin und LPS zeigte eine geringere Ausprägung der Schädigung. Da Histamin eine bedeutende Rolle in der Ausbildung von akuten und chronischen Entzündungen hat, könnte dieser Effekt mit der Modulation inflammatorischer Zytokine in Verbindung stehen (Masaki et al. 2005). In einem experimentellen Leberzirrhose-Modell mit CCl_4 konnte an Ratten eine Downregulation des H1 und H2 Rezeptors in allen Stufen der Entstehung der Zirrhose gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (Peng et al. 1996).

Damit kann dem Histamin eine Bedeutung bei Leberschäden und deren Reparaturvorgängen zugeschrieben werden.

4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob hepatische Stellatzellen, hepatische Parenchymzellen und Endothelzellen die von-Willebrand-Faktorspaltende Protease ADAMTS13 basal sezernieren, und ob die Sekretion durch TGF- β 1 und Histamin zusätzlich stimuliert werden kann. Hierzu sollte die basale und stimulierbare Expression und Sekretion von ADAMTS13 an zwei verschiedenen hepatischen Zelllinien und einer Endothelzelllinie eingehend charakterisiert werden.

Die Untersuchungen wurden an der hepatischen Parenchymzelllinie Hep-G2 und der hepatischen Stellatzelllinie LX-2 durchgeführt. Die Auswahl der Zelllinien erfolgte aufgrund der Tatsache, dass hepatische Stellatzellen als Hauptquelle der ADAMTS13-Synthese gelten und die Parenchymzellen den mit Abstand größten Zellanteil bilden. Die Expressionsuntersuchungen wurden methodisch mit einer immunzytochemischen Färbung (LSAB) und verschiedenen anti-ADAMTS13 Antikörpern durchgeführt und mittels Durchflußzytometrie bestätigt. Mit der LSAB-Methode wurde ein qualitativer und in der Durchflußzytometrie ein quantitativer Nachweis erbracht. Für die hepatische Sternzelllinie LX-2 wurde darüber hinaus die Expressierung des charakteristischen Markers α -Smooth-Muscle-Actin mittels LSAB und Durchflußzytometrie bestimmt. Da dies ein Marker für die Aktivierung der hepatischen Stellatzellen ist, galt es zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der ADAMTS13- und der α -Smooth-Muscle-Actin-Expression bzw. der damit einhergehenden Transformation zum Myofibroblasten besteht. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob beide Zelllinien kontinuierlich, ohne externe Reize ADAMTS13 in den Zellkulturüberstand abgeben. Von besonderem Interesse ist dabei die Rolle der Parenchymzellen, da die Stellatzelle bereits als eine wichtige Synthesequelle bekannt ist. Nach der Bestätigung der Expressierung und der basalen Sekretion galt es eine Möglichkeit zu finden, diese Vorgänge zu beeinflussen. Da in der physiologischen Lebermorphologie ein direkter Kontakt zwischen den hepatischen Zelltypen besteht sollte in einer Kokultur eine mögliche Beeinflussung der hepatischen Zelllinien hinsichtlich der ADAMTS13-Konzentration nachgewiesen werden. Als externe Reize wurden die Auswirkungen des profibrotischen Zytokins TGF- β 1 und des inflammatorischen Mediators Histamin auf den ADAMTS13-Gehalt der Zellen untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Auswirkung von Histamin auf die Zelllinien, da Histamin an Endothelzellen zu einer vWF-

Ausschüttung führt und dies für eine gemeinsame Regulation von Substrat (vWF) und Enzym (ADAMTS13) spricht. Daraus resultierend erfolgte eine genauere Untersuchung der histaminvermittelten Sekretionssteigerung von ADAMTS13 an den hepatischen Zelllinien zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse über dessen Mechanismus. Zu diesem Zweck wurden Zellvitalitätsbestimmungen nach Histamininkubation durchgeführt, da eine Permeabilisierung der Zellwand und passive Entleerung des Enzyms zu berücksichtigen war. Es erfolgten immunzytochemische Färbungen an den Zelllinien zum Nachweis der Expression der verschiedenen Histaminrezeptorsubtypen H1-H4. Zur Eingrenzung eines verantwortlichen Histamin-Rezeptorsubtypes wurden Histaminantagonisten und selektive Histaminagonisten eingesetzt. Mit dem Ziel der Bestätigung einer bestimmten Signalkaskade wurden selektiven Signalkaskadeninhibitoren verwendet. Als abschließender Versuch sollte die primär an Zellkulturen beobachtete Histaminstimulation an einem komplexen Gewebeverband ausgeführt werden. Dafür wurden humane Nabelschnurvenen analog zur Zellkultur ebenfalls mit Histamin stimuliert, um einen ersten Hinweis darauf zu bekommen, ob dies ein physiologischer Prozess ist. Ziel dabei war die Stimulation der umbilikanischen Endothelzellen, als bekannte Quelle der ADAMTS13-Synthese, in einem annähernd lebensechten Zellverband.

5 Methodik

5.1 Materialien

Reagenzien

- ADAMTS13-Enzym, rekombinant, human (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Alamar Blue (AbD Serotec, Düsseldorf)
- Antibody Stabilizer auf TRIS Basis (Candor, Weißensberg)
- Biotin Blocking System (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Blocking Peptide H1, H2, H3, H4 Rezeptor (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Blocking Solution (Candor, Weißensberg)
- Chromogen Red System (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Dimaprit Hydrochlorid (Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien)
- Diphenhydramin Hydrochlorid (Sigma Aldrich, München)
- DMSO (WAK-CHEMIE Medical GmbH, Steinbach)
- Fast Red Substrat System (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Histamin (Sigma Aldrich, München)
- Low Cross Puffer (Candor, Weißensberg)
- Methylhistaprodifen (Sigma Aldrich, München)
- PBS-Puffer (Serag-Wiessner, Naila)
- p-Nitrophenylphosphat (Roche, Basel, Schweiz)
- Ranitidin Hydrochlorid (Sigma Aldrich, München)
- Streptavidin/Alkalische Phosphatase (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Substrat Puffer für p-Nitrophenylphosphat (Diethanolamin, MgCl, Aqua dest.)
- TGF- β 1, rekombinant, human (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Thioperamid (Sigma Aldrich, München)
- TRIS Puffer 0,05M
- Trypanblau 0,5%
- Trypsin/EDTA-Lösung (19,8 g/l PM14-Medium (SERVA, Heidelberg) mit 2 mM EDTA (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim) und 1% bovines Serumalbumin (SERVA, Heidelberg)
- Waschpuffer für ELISA (Technoclone, Heidelberg)

- Waschpuffer für Immunhistochemie (Candor, Weißensberg)

Antikörper

- Anti-Histamin H1 Rezeptor, Ziege, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti-Histamin H2 Rezeptor, Ziege, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti-Histamin H3 Rezeptor, Ziege, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti-Histamin H4 Rezeptor, Ziege, polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti- α -Smooth-Muscle-Actin, monoklonal, Maus (Sigma Aldrich, München)
- Anti-ADAMTS13, Klon A10, monoklonal, Maus (Abcam, Cambridge, Großbritannien)
- Anti-ADAMTS13, Klon 12.1, monoklonal, Maus (American Diagnostics, Stanford, USA)
- Anti-ADAMTS13, polyklonal, Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti-ADAMTS13, polyklonal, Kaninchen (Technoclone, Heidelberg)

Sekundärantikörper

- Anti-Ziege, polyklonal, Kaninchen, Biotin-konjugiert (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- Anti-Maus, polyklonal, Ziege, Biotin-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Anti-Kaninchen, polyklonal, Ziege, Biotin-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark)
- Anti-Maus, polyklonal, Kaninchen, Alkalische Phosphatase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).
- N-Universal Negativ Kontrolle, Maus (Dako, Glostrup, Dänemark)
- N-Universal Negativ Kontrolle, Kaninchen (Dako, Glostrup, Dänemark)

Geräte und sonstige Materialien

- CO₂-Brutschrank (5% CO₂, 37 °C), (Heraeus Thermoscientific, Langenselbold)

- Culture Slides (BD Bioscience, Bedford, USA)
- ELISA-Platten Maxisorp (Nunc GmbH, Langenselbold)
- Feinwaage (Sartorius, Goettingen)
- Plattenphotometer Spectra III (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Plattenphotometer Software: easyWIN fitting Version V6.1 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Shandon Cytospin 4-Zytozentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Bonn)
- Zellkulturgefäße (Greiner, Frickenhausen)
- Durchflusszytometer (Beckmann Coulter, Krefeld)

5.2 Zellkultur

5.2.1 Zellkulturen

Da die Leber als Hauptsyntheseort von ADAMTS13 identifiziert wurde, erfolgten in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Untersuchungen an der hepatischen Parenchymzelllinie (Hep-G2) und der hepatischen Stellatzelllinie (LX-2) zur Charakterisierung von ADAMTS13-Gehalt und -Sekretionsverhalten.

Hep-G2

Hep-G2 ist eine humane, hepatozelluläre Kulturlinie, welche 1975 aus dem Tumorgewebe eines hepatozellulären Karzinoms etabliert wurde (Datenblatt DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig). Es ist eine adhärente Zelllinie, die als Monolayer in kleinen Zellaggregaten wächst. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% FKS und dem Zusatz von 50mM Gentamycin. Die Subkultivierung erforderte die Ablösung der adhärenen Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung. Trypsin führt zur Ablösung extrazellulärer Proteine und EDTA, als Chelatbildner, unterbindet aufgrund der Komplexbildung mit Calcium die Zelladhäsion. Dabei wandelt sich die ursprüngliche Morphologie der Zellen nach Ablösung vom Untergrund in eine kugelförmige Gestalt ohne charakteristische Ausläufer. Die Subkultivierung, d.h. die Verminderung der Zellzahl auf 4×10^4 /ml erfolgte im Abstand von 3-4 Tagen.

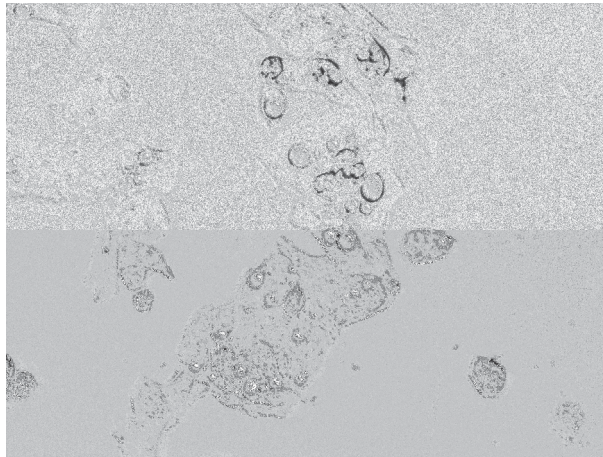


Abbildung 5.1: Zellkulturlinie Hep-G2, Vergrößerung x 200

LX-2

LX-2 ist eine humane, hepatische Stellatzellkulturlinie (engl. hepatic stellate cell – HSC). Es ist ebenfalls eine adhären wachsende Zelllinie, deren Morphologie sich als homogener Zellrasen mit zahlreichen sternförmigen Ausläufern präsentiert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 1% FKS und dem Zusatz von 50mM Gentamycin (Xu et al. 2005). Die Subkultivierung wurde äquivalent zur Hep-G2-Zelllinie unter der Verwendung von Trypsin/EDTA zur Ablösung und Vereinzelung des Zellrasens durchgeführt. Die Konfluenz der *In vitro*-Kultur wurde aufgrund eines größeren Zelldurchmessers im Vergleich zur Hep-G2 schneller erreicht, so dass die Subkultivierung bereits nach 2-3 Tagen mit einer Zellkonzentration von 2×10^4 /ml erfolgte.

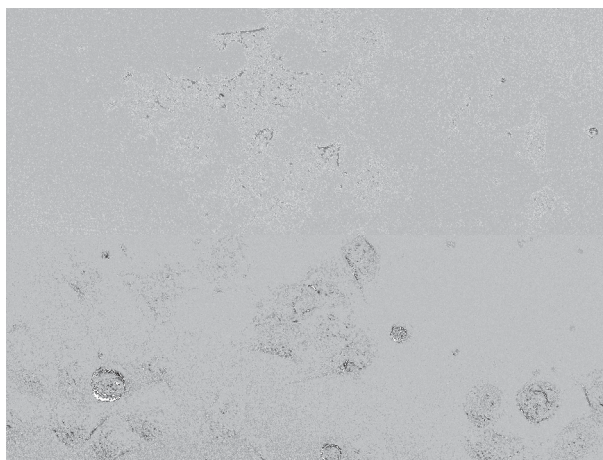


Abbildung 5.2: Zellkulturlinie LX-2, Vergrößerung x 200

EA.hy926

EA.hy926 ist eine humane, venöse Endothelzelllinie, welche aus der Fusion primärer Nabelschnurvenenendothelzellen und der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549/8 etabliert wurde (Edgell et al. 1983). Sie wächst adhärent und präsentiert sich in der endothelzelltypischen Gestalt mit schlanker, spindelförmiger Struktur. Die Kultivierung erfolgte in NB-Medium bei 10% FKS und dem Zusatz von 50mM Gentamycin. Das NB-Medium beinhaltet eine 1:1-Mischung aus IMDM- und HAM's-F12-Medium (beide Biochrom AG, Berlin) mit 200mM stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin) als Stickstoffquelle.

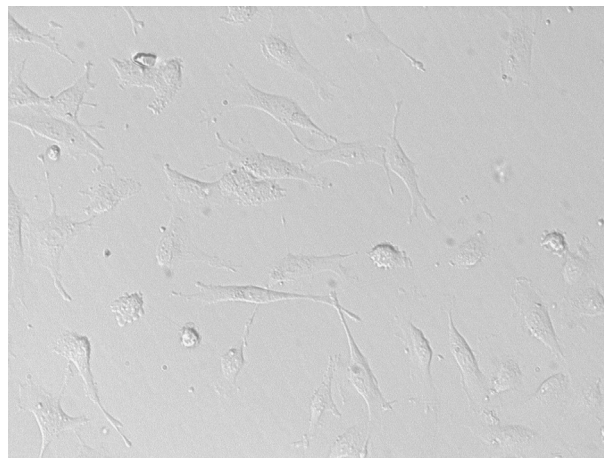


Abbildung 5.3: Zellkulturlinie EA.hy926, Vergrößerung x 200

OVCAR-3

OVCAR-3 ist eine humane, Ovarialkarzinom-Zelllinie, die aus einem malignen Aszitespunktat einer Patientin mit einem ovariellen Adenokarzinom etabliert wurde (Hamilton et al. 1983). Die Zelllinie wächst adhärent als Monolayer. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% FKS, 6µl/ml Insulin und dem Zusatz von 50mM Gentamycin. Die Subkultivierung erfolgte im Abstand von 3-4 Tagen mit einer Zellzahlkonzentration von 4×10^4 /ml.

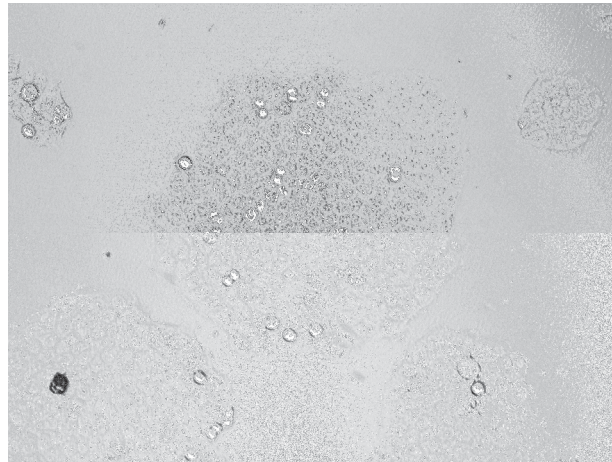


Abbildung 5.4: Zellkulturlinie OVCAR-3, Vergrößerung x 200

5.2.2 Zellzählung und Vitalitätstestung mit Trypanblau

Die wiederholte Vitalitätstestung einer laufenden Zellkultur ist unerlässlich zur Überprüfung des Zustandes der Zellen. Der Trypanblautest beruht auf dem Prinzip, dass geschädigte bzw. tote Zellen eine beeinträchtigte Zellmembranstruktur aufweisen. Daher kommt es aufgrund der erhöhten Permeabilität zu einem Einstrom des blauen Farbstoffes in die Zelle. Trypanblau wurde in einer Konzentration von 0,5% in physiol. NaCl verwendet. Geschädigte Zellen erscheinen demzufolge blau, wohingegen vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen.

Die Zellsuspension wird 1:1 mit Trypanblau versetzt (20µl Zellsuspension + 20µl Trypanblau) und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Aus dem Verhältnis der lebenden und toten Zellen kann die Vitalität bestimmt werden:

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Anzahl Gesamtzellen}} \times 100\%$$

5.2.3 Kokultur

Da *in vivo* zwischen den hepatischen Stellatzellen im Disse-Raum und den angrenzenden hepatischen Parenchymzellen ein direkter Zellkontakt besteht, sollte eine Beeinflussung der Zelllinien bezüglich ihrer ADAMTS13-Expression in einer Kokultur überprüft werden.

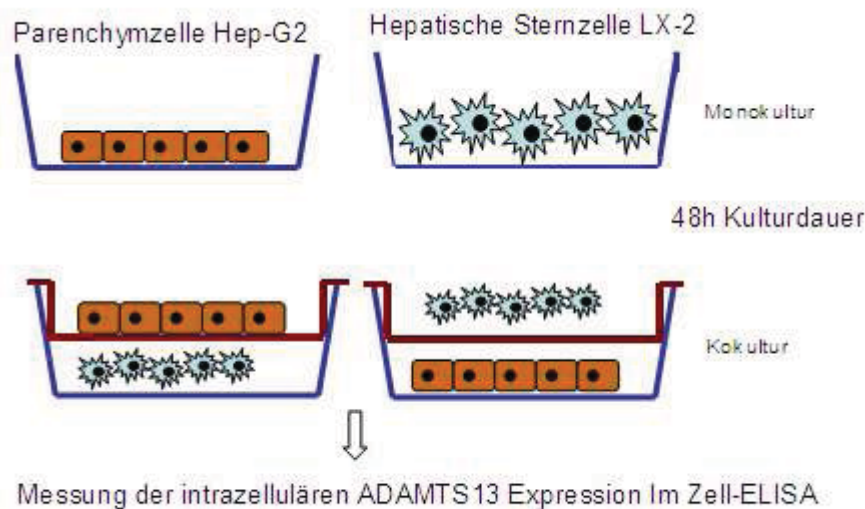


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Methode Kokultur mit den Zellkulturen Hep-G2 und LX-2

Für diesen Versuch wurden die Zellen (Hep-G2 oder LX-2) mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in eine 24-Well-Platte ausgesät, in der sich die Zellen am Boden ansiedelten. Zusätzlich wurde in diese Platte ein Cell Culture Insert eingesetzt, das als Boden eine durchlässige Membran mit einer Porengröße von $8 \mu\text{m}$ besitzt. Diese verhindert einen direkten Zellkontakt, lässt aber z.B. Cytokine oder andere Botenstoffe passieren. In diesen Einsatz wurde nun die jeweils andere Zelllinie (LX-2 oder Hep-G2) mit einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml eingesät und diese zusammen für 48-72h in DMEM mit 1% FKS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aus der 24-Well-Platte und aus dem Insert mit Trypsin/EDTA geerntet, mit PBS gewaschen und im Zell-ELISA (siehe 5.5.2) auf ihre intrazelluläre ADAMTS13-Expression hin überprüft.

5.3 Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)

Bei der LSAB handelt es sich um eine immunozytochemische Färbung, deren Prinzip auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin basiert. Ein biotinylierter Antikörper wird durch eine Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase erkannt und ein farbiges Substrat umgewandelt.

LSAB-Labeled Streptavidin-Biotin-Methode

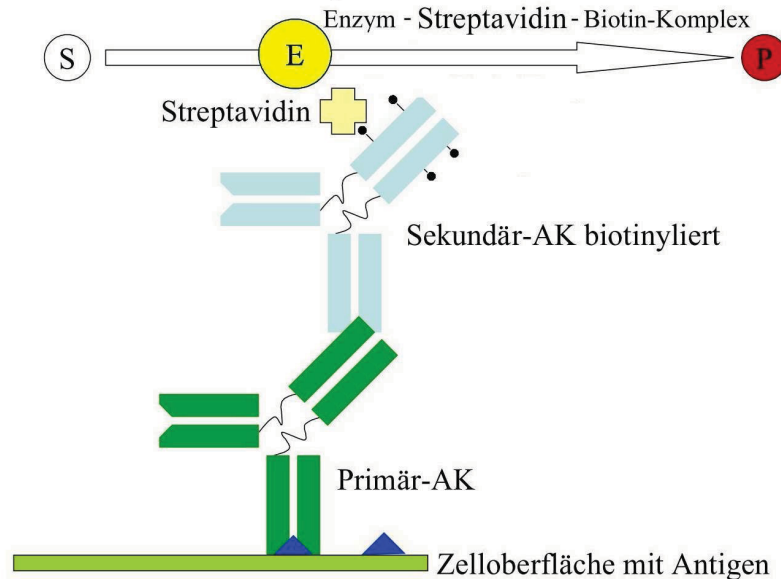


Abbildung 5.6: Schematische Darstellung der LSAB-Methode (Labeled Streptavidin-Biotin) zum Anfärben zellulärer Antigene, nach S. Ulm (S=Substrat, E=Enzym, P=Produkt)

Die jeweiligen Zellen der Zelllinien Hep-G2, LX-2 und EA.hy926 wurden entweder mit einer Cytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht oder direkt in gekammerten Objektträgern (Cytoslides) ausgesät.

Die Herstellung von Cytospins erfolgt mit Hilfe von Zentrifugalkräften (3min bei 200g), bei der die Zellen auf einen definierten Bereich eines Objektträgers sedimentiert werden. Pro Cytospin-Auftrag wurden 1×10^4 Zellen verwendet, welche zuvor in 100µl Low-Cross-Puffer aufgenommen wurden. Nach der Zentrifugation erfolgte die Fixierung der Zellen für 1min mit eiskaltem Methanol und anschließend für 1min mit eiskaltem Aceton, was neben der Konservierung der Zellantigenstrukturen eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran für den Antikörper zum Nachweis intrazellulärer Antigene bewirkt. Darüber hinaus ermöglicht es, die Cytospins für einen längeren Zeitraum bei -21 °C aufzubewahren.

Eine Alternative zum Auftragen der Zellen auf einen Objektträger mittels Zentrifuge ist die direkte Aussaat der Zellen in Culture Slides. Die Kultivierung erfolgt dabei in fixierten Kammern auf der Glasoberfläche eines Objektträgers, so dass acht voneinander abgegrenzte Bereiche für die Zellkultur zur Verfügung stehen. Nach Beendigung der Kultur können immunzytochemische Färbungen direkt in den einzelnen Kammerbereichen durchgeführt werden. Diese Methode hat den Vorteil,

dass die ursprüngliche Zellmorphologie dabei erhalten bleibt und nicht wie beim Ablösen der adhärennten Zellen durch die Einwirkung von Trypsin/EDTA verändert wird. Dies ermöglicht die Färbung eines intakten Monolayers und damit eine bessere Zuordnung der angefärbten Areale im Zellgesamtbild.

Da die Zelllinien Hep-G2 und LX-2 beide hepatischer Herkunft sind, galt es eine Verfälschung der Färbung aufgrund des Vorliegens von endogenem Biotin zu vermeiden. Daher wurde als erster Schritt der immunozytochemischen Antigenfärbung die Inkubation mit Biotin Blocking Solution durchgeführt. Anschließend erfolgte eine unspezifische Blockierung von Proteinbindungsstellen mit Candor-Blocking Solution (niedermolekulares Casein). Als Primärantikörper dienten monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen das jeweils zu untersuchende Antigen in der entsprechenden Arbeitskonzentration (s.u. Auflistung der Antikörper). Der Sekundärantikörper war ein biotinyliertes anti-Maus-, anti-Kaninchen- oder anti-Ziege-Immunglobulin. An das Biotin bindet das Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Reagenz. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, was eine Verstärkung des Signals bedingt. Die Alkalische Phosphatase setzt das Substrat Chromogen Red (bzw. Fast Red) um, welches eine Rotfärbung des Präparates bewirkt. Die Zugabe von Levamisol, einem endogenen Alkalische Phosphatase-Inhibitor, verhinderte das Auftreten einer unspezifischen Färbung. Als letzter Schritt folgte die Gegenfärbung mit dem Zellkernfarbstoff Hämatoxilin, um die Zellen in der Gesamtstruktur besser zu erkennen.

Die LSAB wurde zur Untersuchung folgender Antigene durchgeführt:

ADAMTS13-Nachweis an den Zelllinien LX-2, Hep-G2, EA.hy926 und OVCAR-3 mit den monoklonalen anti-ADAMTS13-Antikörpern

- Klon 12.1 (American Diagnostics, Stamford, USA), Subklasse: IgG1, 5,0µg/ml
- Klon 5.1 (American Diagnostics, Stamford, USA), Subklasse: IgG1, 5,0µg/ml
- Klon A 10 (Abcam Cambridge, Großbritannien), Subklasse: IgG2b, 5,0µg/ml

und den polyklonalen anti-ADAMTS13-Antikörpern

- von Santa Cruz Biotechnology, (Heidelberg), 4,0µg/ml und
- Technoclone, (Heidelberg), 4,0µg/ml.

Histaminrezeptorsubtyp-Nachweis an den Zelllinien LX-2, Hep-G2, EA.hy926 mit den polyklonalen Antikörpern

- anti-H1-Rezeptor
- anti-H2-Rezeptor
- anti-H3-Rezeptor
- anti-H4-Rezeptor (alle von Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), 4,0µg/ml

α-Smooth-Muscle-Actin-Nachweis an der Zelllinie LX-2 mit dem monoklonalen Antikörper

- anti-α-Smooth-Muscle-Actin (Sigma Aldrich, München), Subklasse IgG2a, 5µg/ml

Die Negativkontrolle bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers erfolgte mittels paralleler Inkubation einer Vergleichsprobe mit einem Immunglobulin der jeweiligen Subklasse (Isotyp-Kontrolle) des benutzten Antikörpers bzw. bei den polyklonalen Antikörpern mit Kaninchen-Immunglobulinen. Eine weitere Variante war die Verwendung der N-Universal Negativkontrolle Maus (Dako) und N-Universal Negativkontrolle Kaninchen (Dako).

Für die Histaminrezeptor Antikörper existieren spezifische Blockierpeptide H1 bis H4 (Santa Cruz Biotechnology), welche mit dem Antikörper bei 4 ° C über Nacht inkubiert werden und dabei die Bindungsstellen des Antikörpers absättigen, sodass diese nicht mehr an das Antigen binden können.

Zur Auswertung der gefärbten Zellen kam ein semiquantitatives Punktesystem zur Anwendung, mit dem man die Ergebnisse der Färbung dokumentieren und vergleichen kann:

+++	starke Färbung
++	mittlere Färbung
+	leichte Färbung
-	keine Färbung

Dennoch ist die Beurteilung der Färbung vom Betrachter abhängig und daher als qualitativer Nachweis des zu untersuchenden Antigens zu werten.

5.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Antigenen. Ein wichtiges Hilfsmittel ist dabei die Markierung von spezifischen Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen, die bei spezifischer Anregung von einem Photodetektor registriert werden können und somit eine Aussage über die Menge an gebundenem Antikörper und auch der Antigendichte liefern.

Zum Test wurden ca. 1×10^6 Zellen mit Trypsin/EDTA/PBS wie beschrieben abgelöst, gezählt und in 3ml EDTA/PBS-Lösung aufgenommen und wieder abzentrifugiert. Als nächster Schritt folgte die Zellpermeabilisierung, um dem Antikörper zu ermöglichen, auch an intrazelluläre Antigene zu binden. Dazu wurden zur Zellsuspension Paraformaldehyd (4% in PBS) für 15min und Triton X-100 (0,15% Lösung in PBS mit 0,1% BSA) für 2,5min zugesetzt und die Zellsuspension bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut ein Waschvorgang wie beschrieben durchgeführt. Nun schloss sich für 15min die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper bzw. bei Kontrolle mit der entsprechenden Antikörpersubklasse an. Nach Entfernen des Primärantikörpers aber ohne Waschvorgang folgte darauf der Zusatz des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers für 10min in entsprechender Subklasse. Nach einem letzten Waschvorgang mit Verwerfen des Überstandes wurden 50µl der Zellsuspension in 500µl Messlösung aufgenommen und standen damit zur Analyse mittels Durchflusszytometer (Coulter) zur Verfügung.

Die Durchflusszytometrie wurde zur Untersuchung der folgenden Antigene verwendet:

- ADAMTS13-Nachweis in LX-2- und Hep-G2-Zellen mit dem monoklonalen anti-ADAMTS13-Antikörper, Maus, Klon 12.1 (Subklasse: IgG1, 5,0µg/ml)
- α -Smooth-Muscle-Actin-Nachweis in LX-2 mit dem monoklonalen anti- α -Smooth-Muscle-Actin-Antikörper, Maus, Subklasse: IgG2a, 4,5µg/ml)

Es wurden folgende an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt:

- FITC (Fluoresceinisothiocyanat) anti-Maus, Subklasse IgG1
- PE (Phycoerythrin) anti-Maus, Subklasse IgG2a.

5.5 ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay)

5.5.1 ADAMTS13-Nachweis im Zellkulturüberstand

Das Prinzip eines Enzymimmunoassays ist die Bindung eines Markermoleküls mittels eines spezifischen Antikörpers an ein nachzuweisendes Antigen. Durch das Markermolekül (ein Enzym, das ein farbgebendes Substrat umsetzt) wird ein Signal erzeugt, welches detektiert und quantifiziert werden kann.

Zur Durchführung des Tests erfolgte als erster Schritt das so genannte Coating (dt. Beschichtung), bei dem ein spezifischer Antikörper bzw. das Antigen direkt an der Festphase (ELISA-Platte) immobilisiert wird. Dabei ist auf eine geeignete Auswahl der ELISA-Platte zu achten, da Unterschiede in den Bindungseigenschaften z.B. für Proteine existieren. Standard ist die 96-Well-Platte mit flachem Boden, die in einem Platten-Photometer gemessen werden kann.

Bei den für diese Dissertation durchgeführten Assays handelt es sich um die indirekte Form, bei der das Antigen (meist Zellkulturüberstand) direkt auf eine MaxiSorp Platte (Nunc) aufgetragen wurde. Die Platte wurde mit je 100µl pro Well über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dreimaliges Waschen mit 200µl Waschpuffer, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Die Bereiche der ELISA-Platte, die kein gebundenes Protein enthalten, wurden anschließend mit je 200µl Candor Blocking Solution pro Well für 30min blockiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher direkt gegen das zu untersuchende Antigen (ADAMTS13) gerichtet ist. Dabei wurden sowohl monoklonale also auch polyklonale anti-ADAMTS13-Antikörper benutzt. Die Inkubation erfolgte erneut über Nacht bei 4°C. Der Sekundärantikörper (anti-Maus: 4,0µg/ml, anti-Kaninchen: 2,5µg/ml, anti-Ziege: 2,0µg/ml) inkubierte für 60min auf dem Plattenschüttler. Als gebundenes Enzym wurde Alkalische Phosphatase genutzt, die das Substrat p-Nitrophenylphosphat unter der Ausbildung einer Gelbfärbung umsetzt. Die Extinktion der Proben wurde nach 30min Inkubation bei 405nm im Plattenreader gemessen. Dies erlaubt eine quantitative Aussage über den Antigengehalt einer Probe.

Der ELISA diente zur Messung eines ADAMTS13-Signals in Zellkulturüberständen der verschiedenen Zelllinien unter bestimmten stimulierten bzw. unstimulierten Bedingungen.

5.5.2 ADAMTS13-Nachweis in/auf der Zelle (Zell-ELISA)

Der Zell-ELISA wird zum Nachweis eines Antigens in der Zelle selbst durchgeführt (ähnlich der LSAB-Methode), wobei im Unterschied dazu keine qualitative Visualisierung des Antigens erfolgte, sondern der Substratumsatz quantitativ gemessen wird.

Beim Zell-ELISA wurden im Gegensatz zum ELISA für den Nachweis von löslichen Antigenproteinen (z.B. ein Antikörper oder ein Enzym) ganze Zellen in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer definierten Wachstumsdauer wurde das Zellkulturmedium nach Zentrifugation (1000U/min für 5min) entfernt und die Zellen in derselben Platte ca. 1h luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 100µl eiskaltem Methanol pro Well für 2min. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und der Entfernung des Methanols stand die Platte nun zur weiteren Durchführung des Enzymimmunoassays zur Verfügung. Die nachfolgenden Schritte waren äquivalent zu einem konventionellen ELISA (s.o.) durchzuführen.

5.6 Histaminstimulation

Nachdem an den untersuchten Zelllinien eine ADAMTS13-Basissekretion im Zellmedium gemessen werden konnte, sollten die Zellen in einen stimulierten Zustand überführt werden. Nach verschiedenen Versuchen fand sich in Histamin eine geeignete Substanz, die es ermöglichte, ein erhöhtes ADAMTS13-Signal im Zellkulturüberstand zu detektieren.

Das Histamin wurde dafür in serumfreien DMEM-Medium gelöst und die Zellen mit einer Arbeitskonzentration von 10 bis 30mM für 20min bei 37°C im Brutschrank stimuliert. Es ist unbedingt zu beachten, dass ausschließlich serumfreies Medium verwendet wird, da das zu 10% im üblichen Zellkulturmedium enthaltene fetale Kälberserum zu falsch hohen ADAMTS13-Messwerten führt. Nach der Stimulation wurde das Zellmedium durch Zentrifugation (2000U/min, 5min) von den Zellen entfernt und anschließend der ADAMTS13-Gehalt im ELISA bestimmt.

5.6.1 Überprüfung der Spezifität der Histaminwirkung

Nach der Messung eines erhöhten ADAMTS13-Signals infolge der Histaminstimulation galt es zu überprüfen, wie spezifisch diese Zunahme ist.

Zu diesem Zweck folgten experimentelle Untersuchungen mit Histaminantagonisten, der Einsatz von selektiven Histaminagonisten und der Gebrauch von spezifischen Signalkaskadeninhibitoren.

Als Histaminantagonisten wurden genutzt:

- H1 Rezeptor: Dimetinden (200µg/ml) und Diphenhydramin (100µg/ml)
- H2 Rezeptor: Ranitidin (100µg/ml)
- H3/H4 Rezeptor: Thioperamid (10µg/ml)

Die Antagonisten wurden entsprechend ihrer Arbeitskonzentration in serumfreien DMEM-Medium gelöst und mit den Zellen (Hep-G2) in einer 24-Well-Platte (Zellzahl 2×10^5) vor der Histaminstimulation für einen definierten Zeitraum inkubiert. Nach der Stimulation wurde der Überstand mittels Zentrifugation (2000U/min, 5min) von den Zellen entfernt und im anschließend mittels ELISA der ADAMTS13-Gehalt bestimmt.

Als Histaminagonisten wurden genutzt:

- H1 Rezeptor: Methylhistaprodifen (200µM)
- H2 Rezeptor: Dimaprit (5mM)

Die Agonisten wurden entsprechend ihrer Arbeitskonzentration in serumfreien DMEM-Medium verdünnt und mit einer definierten Zellzahl (1×10^6) für 2h inkubiert. Anschließend wurde der ADAMTS13-Gehalt der Zellüberstände ebenfalls nach Abzentrifugation im ELISA bestimmt.

Als Signalkaskadeninhibitoren wurden genutzt:

- BIM I (Proteinkinase C-Inhibitor), 100nM
- SU 11274 (Met-Tyrosinkinaseninhibitor, c-Met), 5µM
- PD 98059 (Map-Kinasen Inhibitor, MEK 1), 10µM
- AG 1295 (selektiver Tyrosinkinaseninhibitor am PDGFR Rezeptor), 1µM
- SL 327 (MEK1 und MEK2 Inhibitor), 1µM

Die Inhibitoren wurden in ihrer entsprechenden Arbeitskonzentration für 30min mit 2×10^5 Zellen in einer 24-Well-Platte vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Histaminzugabe (20mM) und eine Inkubation für 20min im Brutschrank. Die

Inhibitoren wurden von Dr. Roland Kaufmann (Arbeitsgruppe: Allgemeine Viszeral- und Gefäßchirurgie, Jena) bereitgestellt.

Nach der spezifischen Vorbehandlung der Zellen wurden die Proben im ELISA auf den ADAMTS13-Gehalt getestet.

5.6.2 Zellvitalitätstestung mit Alamar Blue

Eine einfache Methode zur Identifikation von zytotoxisch wirksamen Substanzen ist der Alamar Blue Assay. Alamar Blue ist ein wasserlöslicher, nicht-toxischer blauer Farbstoff, welcher von den Zellen entsprechend ihrer proliferativen Aktivität zu einem pinkfarbenen Farbstoff reduziert wird. Die katalytische Wirkung von NADPH/NADH-abhängiger Dehydrogenasen wird durch die Reduktion des Farbstoffes in den Zellen sichtbar gemacht, deren Konzentration proportional zur Zellproliferation und zur Vitalität der Zellen ist.

Hierzu erfolgte die Aussaat der Zellen in einer geeigneten Konzentration z.B. 100µl einer Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen/ml in eine 96-Well-Zellkulturplatte. Nach ca. 24h Kulturdauer konnte die Testsubstanz verabreicht werden. Im Anschluss an die Inkubation der Zellen mit der zu testenden Substanz wurde die 96-Well-Platte abzentrifugiert und die Überstände durch vorsichtiges Abkippen auf ein saugfähiges Tuch entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 10µl Alamar Blue in 100µl Zellmedium pro Well. Nach 4h konnte der Farbumschlag photometrisch im Plattenreader gemessen werden. Neben den getesteten Zellen ist auch die Extinktion des Nährmediums ohne Zellen und des mit Alamar Blue versetzten Nährmediums zur Berechnung der relativen Reduktion von Alamar Blue zu bestimmen. Die Messung erfolgte bei einer Lichtwellenlänge von 570nm und 620nm.

Die Berechnung der prozentualen Reduktion des Alamar Blue resultiert aus den folgenden Gleichungen:

Bestimmung von AO_{LW} (570nm) und AO_{HW} (620nm):

AO_{LW} (570nm) = Absorption von Alamar Blue im Medium – Absorption von Medium ohne Alamar Blue

AO_{HW} (620 nm) = Absorption von Alamar Blue im Medium – Absorption von Medium ohne Alamar Blue

Bestimmung von R_0 (Korrekturfaktor)

$$R_0 = AO_{LW}(570nm) / AO_{HW}(620nm)$$

Bestimmung der prozentualen Reduktion:

$$A_{LW} = A_{Zelle}(570nm) - A_{Medium}(570nm)$$

$$A_{HW} = A_{Zelle}(620nm) - A_{Medium}(620nm)$$

A_{Zelle} - Absorption des Alamar Blue nach 4h Einwirkzeit

A_{Medium} - Absorption von Medium ohne Alamar Blue

$$\text{Prozentuale Reduktion} = [A_{LW} - (A_{HW} \times R_0)] \times 100\%$$

.

Die Zellvitalitätstestung mit Alamar Blue wurde zur Bestimmung des zelltoxischen Einflusses von Histamin und des zellproliferativen Einflusses von TGF- β 1 auf die verschiedenen Zellkulturen eingesetzt.

5.7 Nachweis von ADAMTS13 in der Nabelschnur

Nachdem in der Zellkultur humane Endothelzellen auf ihren ADAMTS13-Gehalt untersucht wurden, war das nächste Ziel, eine Annäherung an ein *In vivo*-Modell zu finden. Als praktikable Lösung wurde dafür ein Perfusionsexperiment mit Nabelschnurvenen genutzt. Die Bereitstellung der Nabelschnüre fand durch das Plazentalabor (Leitung: Professor Schleussner) der Universitätsfrauenklinik Jena statt.

Als erster Schritt erfolgte das mehrmalige Durchspülen der Nabelschnurvenen mit PBS Puffer, um Blutreste zu entfernen. Dafür wurden die Nabelschnurvenen mit einem Venenverweilkatheter sondiert und gewaschen bis die Spülflüssigkeit (PBS Puffer) klar erschien. Danach wurde die Nabelschnur in zwei gleich große Stücke geteilt, um eine unstimulierte Vergleichsprobe zur Verfügung zu haben.

Anschließend wurden die zwei Nabelschnurhälften mit je zwei Butterflöschläuchen sondiert und diese fest verknotet. Danach wurde mithilfe zweier Einwegspritzen 2ml

Histamin (20mM) bzw. serumfreies Zellmedium direkt in die Nabelschnurvenen gefüllt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben aspiriert und anschließend das ausgeschüttete ADAMTS13 ebenfalls im ELISA gemessen.

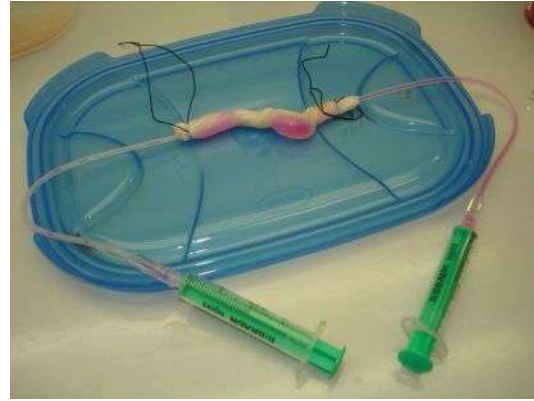
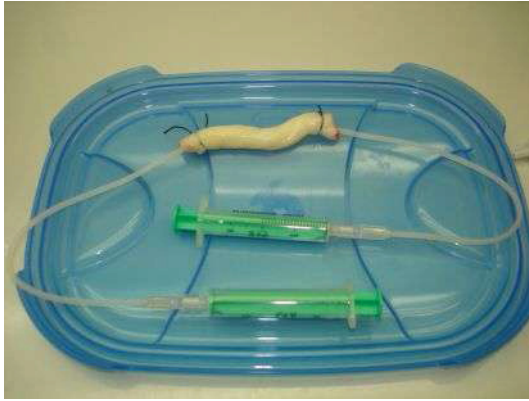


Abbildung 5.7: Durchführung des Nabelschnurperfusionsexperimentes

5.8 Statistische Auswertung

Alle durchgeführten Versuche wurden auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft und daher mindestens einmal wiederholt. In den ELISA-Versuchen wurden pro Probe mindestens 4 Parallelen angesetzt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm PASW Statistic 18 von SPSS.

5.8.1 Standardabweichung und Student's t-Test

Es wurde die Standardabweichung und der p-Wert mittels Student's t-Tests bestimmt. Die Standardabweichung ist ein Maß dafür, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert streuen. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit dem ein Ergebnis als wahr anzusehen ist.

Statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt. Es wurde der 2-seitige, Typ 2 (Zwei Stichproben, gleiche Varianz) Student's t-Tests verwendet. Die Überprüfung der Varianzgleichheit (homoskedatisch) erfolgte mittel Levene-Test.

5.8.2 Ausreißereliminierung nach dem Henning Test

Falls sich in einem ELISA ein Messwert deutlich als Ausreißer präsentierte, wurde dieser unter der Vorraussetzung einer ausreichenden Anzahl an Messwerten von der Auswertung ausgeschlossen. Nach dem Henning-Test (A.M. Raem, P. Rauch. 2006. „Immunoassays“. 22. Aufl. ELSEVIER-Verlag.) liegt ein Ausreißer vor, wenn Q größer ist als die dreifache Standardabweichung.

$$Q = x_1 - \bar{x}$$

x_1 – als Ausreißer verdächtigter Wert

\bar{x} – Mittelwert (unter Ausschluss von x_1)

6 Ergebnisse

6.1 Nachweis von ADAMTS13

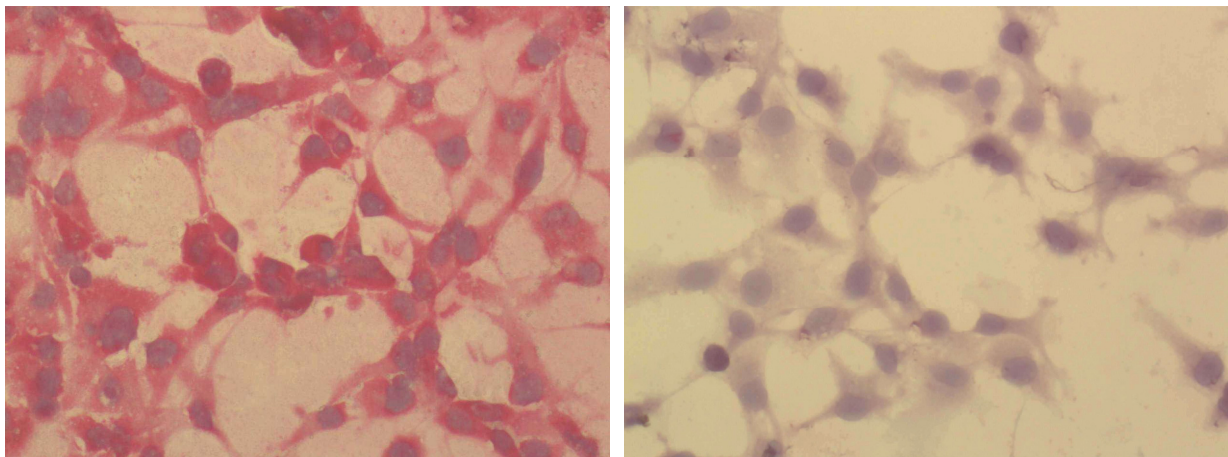
Zunächst wurde die intrazelluläre Konzentration der vWF-spaltenden Protease ADAMTS13 mit der immunozytochemischen Nachweismethode LSAB in den Kulturzellen nachgewiesen. In dieser Arbeit erfolgt die Verwendung des Begriffes „Exprimierung“ zur Beschreibung der intrazellulären Proteinexpression und nicht der Genexpression.

Die Methode erlaubt die Visualisierung des Enzyms ADAMTS13, wobei die Enzymaktivität dabei nicht gemessen wird.

6.1.1 LSAB

Als Nachweis der vWF-spaltenden Protease erfolgte die immunozytochemische Färbung der fixierten Zellen der Zelllinien Hep-G2, LX-2 und EA.hy926. Als Negativprobe wurde die ovarielle Tumorzelllinie OVCAR-3 genutzt.

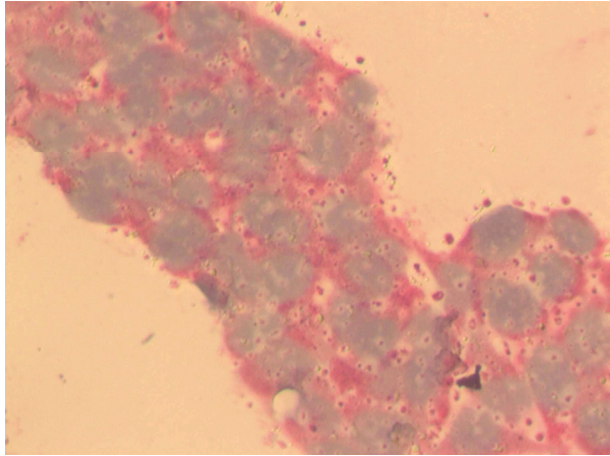
Als exemplarische Darstellung der Ergebnisse wird jeweils eine positive Färbung für ADAMTS13 und die zugehörige Negativprobe mit der jeweiligen Subklasse des Antikörpers präsentiert. An beiden hepatischen Zelllinien konnte eine starke Färbung und damit der ADAMTS13-Nachweis gezeigt werden. Die Endothelzelllinie EA.hy926 wies eine mittlere Färbung auf. Keine Färbung und damit keine ADAMTS13-Expression zeigte die Zelllinie OVCAR-3.



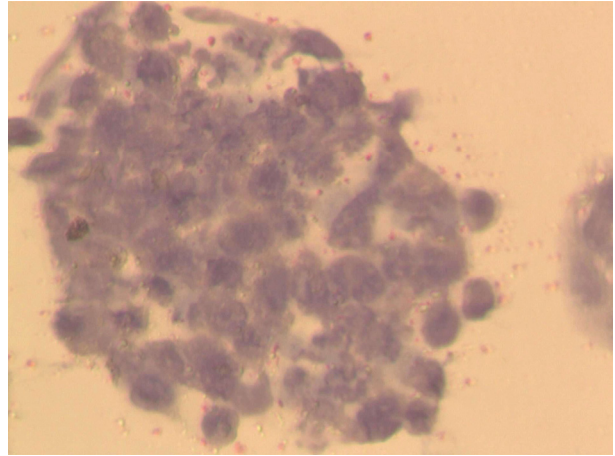
LX-2, ADAMTS 13: positiv (+++)

LX-2, Kontrolle: negativ (-)

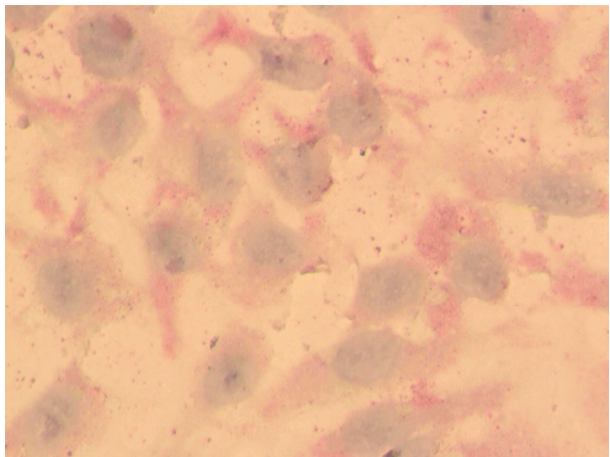
Abbildung 6.1: LX-2 – Immunzytochemischer Nachweis (LSAB) von ADAMTS13



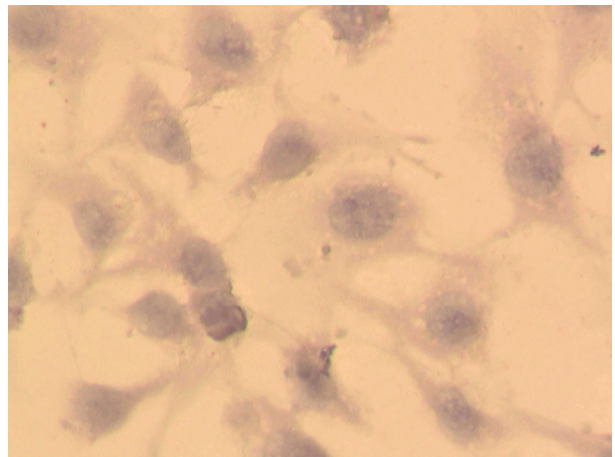
Hep-G2, ADAMTS13: positiv (+++)



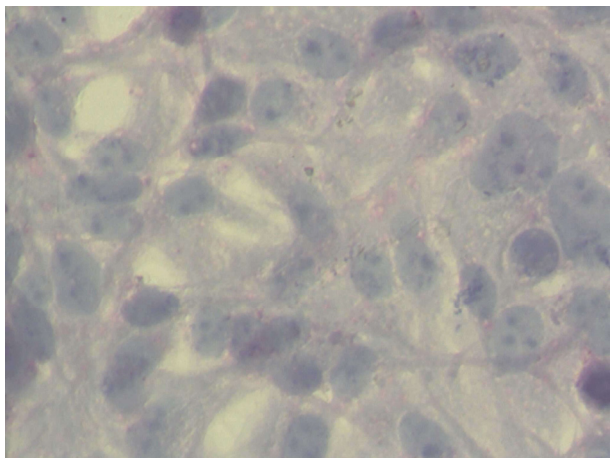
Hep-G2, Kontrolle: negativ (-)

Abbildung 6.2: Hep-G2 - Immunzytochemischer Nachweis (LSAB) von ADAMTS13

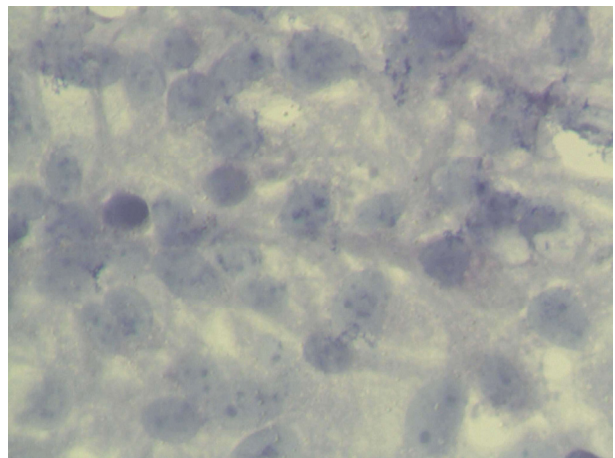
EA.hy926, ADAMTS13: positiv (++)



EA.hy.926, Kontrolle: negativ (-)

Abbildung 6.3: EA.hy926 - Immunzytochemischer Nachweis (LSAB) von ADAMTS13

OVCAR-3, ADAMTS13: negativ (-)



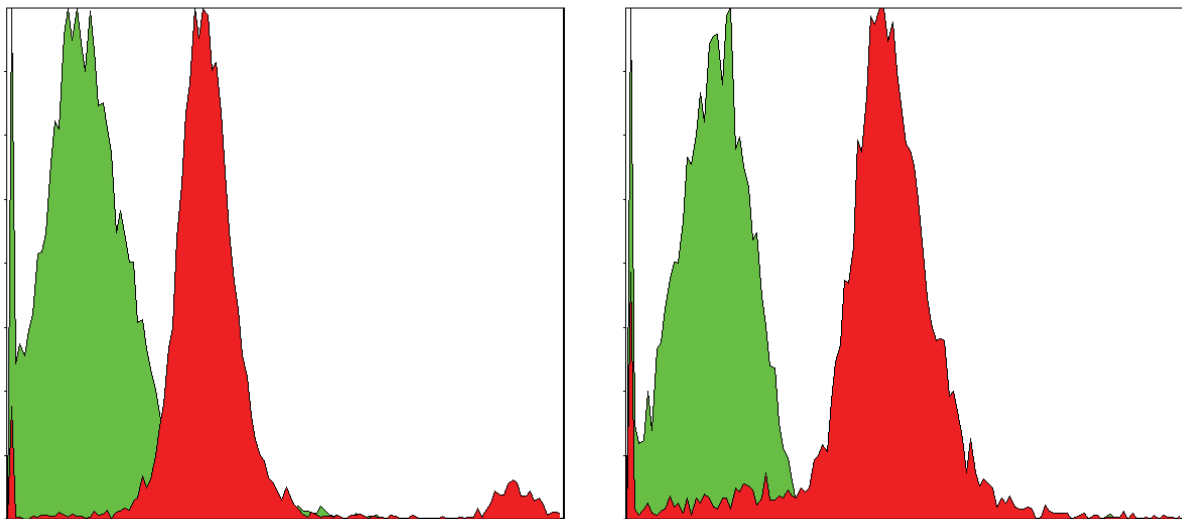
OVCAR-3, Kontrolle: negativ (-)

Abbildung 6.4: OVCAR-3 - Immunzytochemischer Nachweis (LSAB) von ADAMTS13

+++ starke Färbung, ++ mittlere Färbung, + leichte Färbung, - keine Färbung

6.1.2 Durchflusszytometrie

Zur Bestätigung des ADAMTS13-Nachweises und zur quantitativen Bestimmung der Antigenkonzentration wurde die Durchflusszytometrie als weitere Methode verwendet. Dabei erfolgte der intrazelluläre Nachweis des Enzyms nach Permeabilisierung der Zellmembranen. Ein Verzicht auf die Permeabilisierung der Zellen führte zu einem stark verringerten Messsignal (Messwert: nicht permeabilisiert 21,94%). Damit konnte der ADAMTS13-Gehalt als nahezu ausschließlich intrazellulären Ursprungs bestimmt werden. Es zeigte sich erneut, dass die hepatischen Zelllinien Hep-G2 und LX-2 das ADAMTS13-Antigen deutlich exprimieren.



LX-2: ADAMTS13-Signal

Negativkontrolle (3,8%), Messwert (60,5%)

Hep-G2: ADAMTS13-Signal

Negativkontrolle (21,5%), Messwert (84,2%)

Abbildung 6.5: Bestimmung der intrazellulären ADAMTS13-Expression an den Kulturlinien LX-2 und Hep-G2 (Zellzahl 1×10^6) im Durchflußzytometer nach Permeabilisierung mit Paraformaldehyd (4%) und Triton-X-100 (0,15%).

In den Abbildungen 6.5. und 6.12. sind so genannte Overlay-Plots dargestellt, bei denen der Messwert und die Kontrolle in einem gemeinsamen Bild dargestellt werden. Die Ordinate zeigt die Zellzahl, welche für Kontrolle und Messwert gleich sein sollte. Die Abszisse präsentiert die Fluoreszenzintensität und ist damit ein Maß für die Antigendichte. Je weiter das Maximum entlang der Abszisse nach rechts verschoben ist, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal. Eine Aussage über die Stärke der Expression des gesuchten Antigens lässt sich aus der Verschiebung des Maximums im Vergleich zur Kontrolle treffen. Würde das untersuchte Antigen nicht

vorhanden sein, wären die Signale der Kontrolle und des Messwertes deckungsgleich.

6.1.3 Messung von ADAMTS13 im Zellkulturüberstand

Nach dem intrazellulären Nachweis der Protease stellte sich nun die Frage, ob eine Sekretion des Enzyms aus der Zelle heraus erfolgt. Dafür wurden je 1×10^5 /ml Zellen beider Zelllinien über einen Zeitraum von 96h in einem Volumen von 700µl in 24-Well Platten kultiviert und im Abstand von 24h der Kulturüberstand im ELISA gemessen.

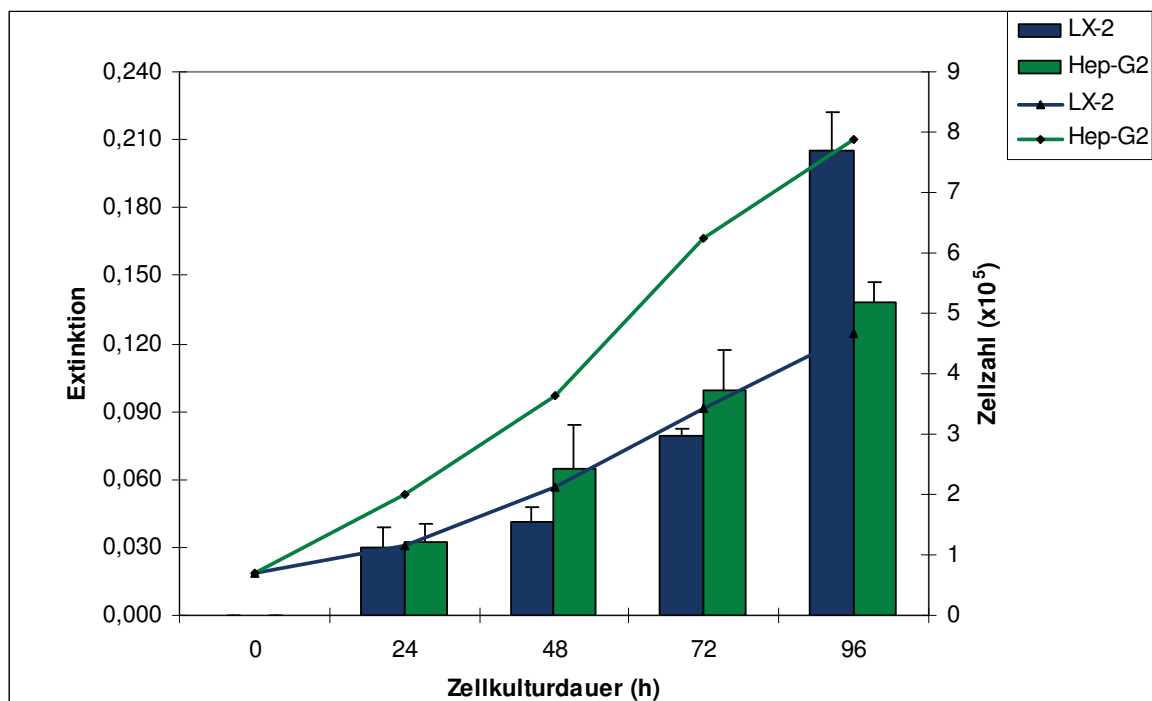


Abbildung 6.6: ADAMTS13-Antigengehalt (Extinktion - Balken) im Zellkulturüberstand (ermittelt im ELISA) mit gleichzeitiger Darstellung der Zellproliferation (Linien) nach Einsaat von 7×10^4 Zellen der Zelllinien LX-2 und Hep-G2 in eine 24-Wellplatte.

Bereits nach 24h konnte eine Ausschüttung von ADAMTS13 nachgewiesen werden. Dieser Wert verstärkte sich über den beobachteten Zeitraum.

Berechnet man die Sekretionsrate als Extinktion (ADAMTS13-Antigen-Gehalt) pro 1×10^5 Zellen wird deutlich, dass die Stellat-Zelllinie LX-2 eine höhere ADAMTS13-Sekretionsleistung gegenüber der Parenchymzelllinie Hep-G2 zeigt (siehe Abbildung 6.7). Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass beide hepatischen Zelllinien ohne externe Stimuli kontinuierlich ADAMTS13 sekretieren.

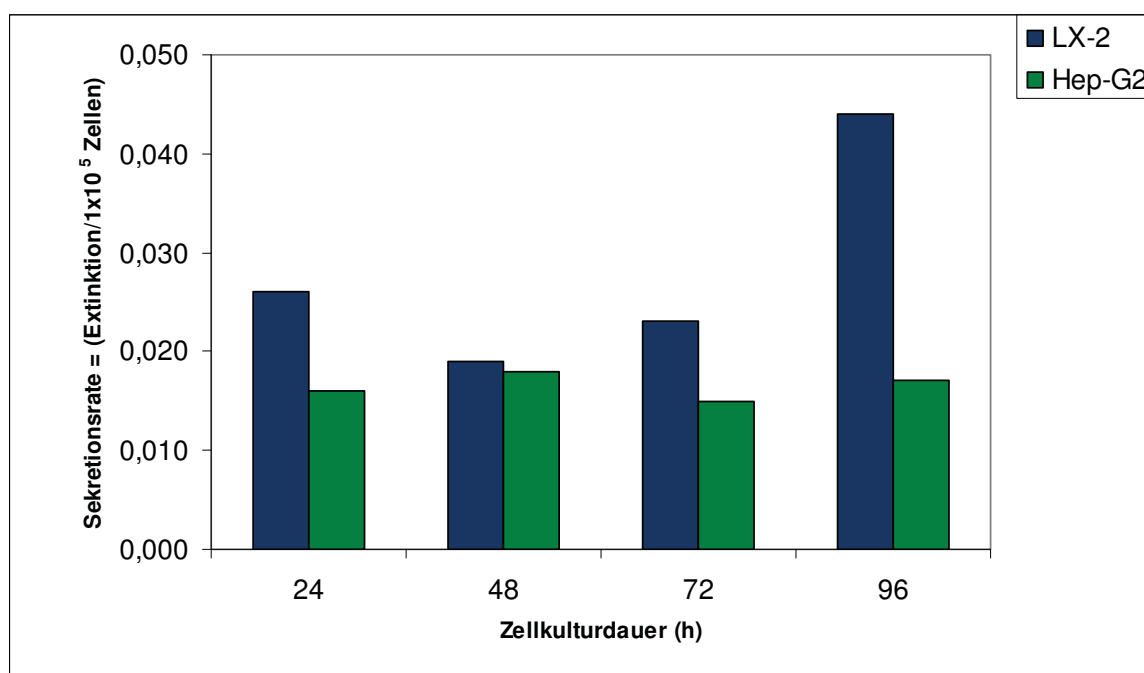


Abbildung 6.7: Darstellung der ADAMTS13-Sekretionsrate von LX-2 und Hep-G2 in Relation zur Kulturdauer.

6.1.4 Kokultur

Für die Kokultur wurden beide Zelllinien in 24-Well-Platten mit Inserts, die die räumliche Trennung der Zellen mittels einer semipermeablen Membran ermöglichte, kokultiviert und anschließend im Zell-ELISA auf den zellulären ADAMTS13-Gehalt in den Zellen untersucht (siehe Abbildung 5.4). Eine Sekretion des Enzyms nach außen in den Zellkulturüberstand wurde dabei nicht erfasst.

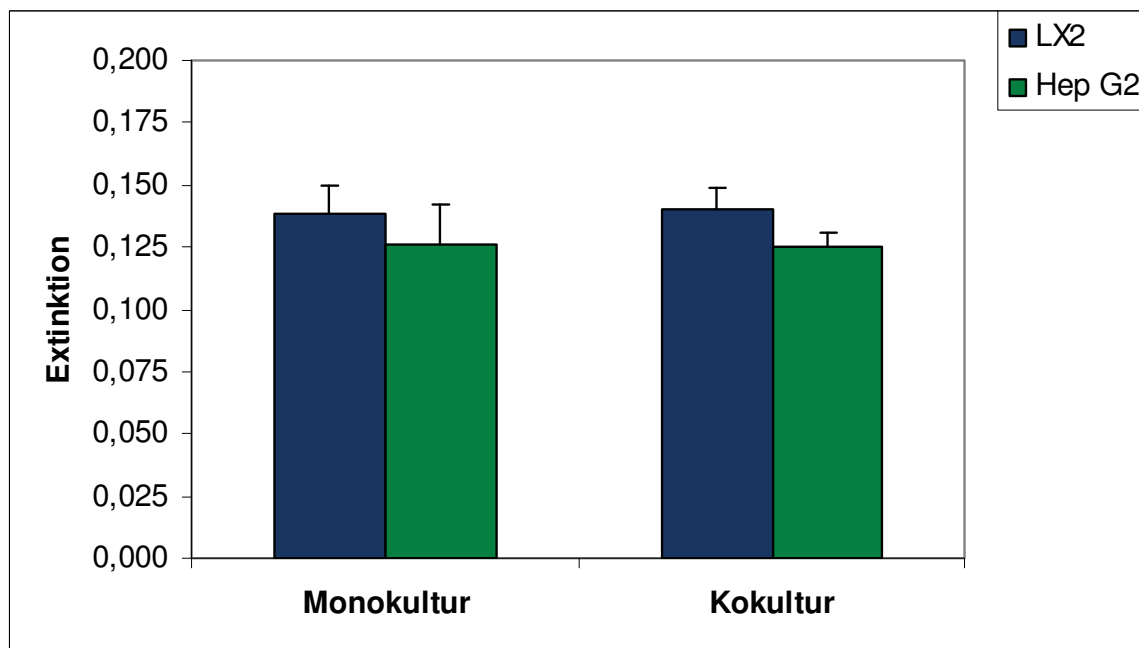


Abbildung 6.8: Zellulärer ADAMTS13-Antigengehalt (Extinktion) im Vergleich zwischen einer herkömmlichen Monokultur und nach Kokultivierung der Zelllinien Hep-G2 und LX-2 in 24 Well-Platten (Zellzahl 1×10^5 /ml) und einer räumlichen Trennung durch eine semipermeable Membran (Inserts) ermittelt im Zell-ELISA nach einer Zellkulturdauer von 48h.

Es konnte keine signifikante Beeinflussung des ADAMTS13-Signals nach Kokultivierung nachgewiesen werden.

6.1.5 Einfluss von TGF- β 1 auf den ADAMTS13-Gehalt

TGF- β 1 ist das wichtigste profibrotische Zytokin (Xu et al. 2005). Es spielt eine herausragende Rolle bei der Entstehung der Leberfibrose im Rahmen einer Leberschädigung bei der es zu einer massiven Vermehrung der extrazellulären Matrix in der Leber kommt. Bedingt durch den Leberzelluntergang kommt es zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (u.a. auch TGF- β 1) und Wachstumsfaktoren. Diese katalysieren die Transformation der hepatischen

Stellatzelle in einen Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp der zur Produktion von großen Mengen extrazellulärer Matrix wie Kollagen oder Proteoglykanen befähigt ist. (Priya et al. 2008). Aufgrund der Frage, ob sich ein inflammatorischer Reiz wie TGF- β 1 auch auf den ADAMTS13-Gehalt der Leberzellkulturlinien auswirkt, wurde der Einfluss von TGF- β 1 für die Zelllinien LX-2 und Hep-G2 im Zell-ELISA untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 48h zeigte sich, dass TGF- β 1 keinen Einfluss auf den zellulären ADAMTS13-Gehalt der Zelllinie LX-2 hat, aber zu einer signifikanten Steigerung des ADAMTS13-Signals bei Hep-G2 führte (siehe Abbildung 6.9).

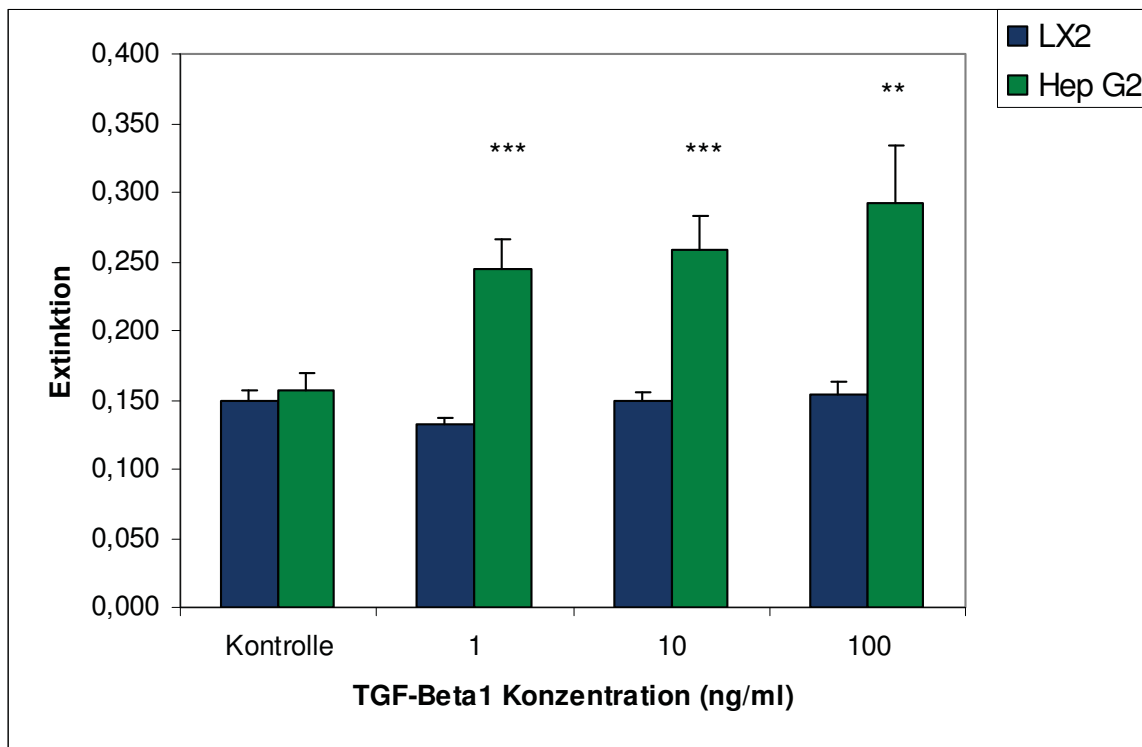


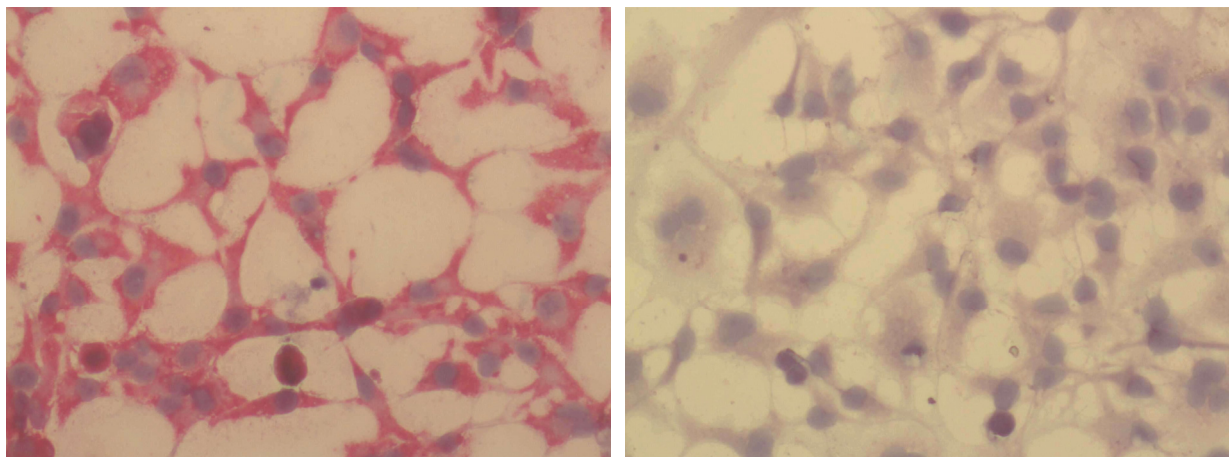
Abbildung 6.9: Bestimmung des zellulären ADAMTS13-Antigengehalt (Extinktion) der Zelllinien Hep-G2 und LX-2 nach 48h Inkubation mit TGF- β 1, ermittelt im Zell-ELISA (Einsaat: Zellzahl 1×10^5 /ml in eine 96-Well-Platte). Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

6.2 Nachweis von α -Smooth-Muscle-Actin

6.2.1 LSAB

α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) ist ein Marker für die Aktivierung der ruhenden hepatischen Stellatzellen. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung des rauen endoplasmatischen Retikulums, den Verlust der Vitamin A Speicherkapazität, das Auftreten von kontraktile Filamenten, die erhöhte Produktion extrazellulärer Matrix und eine gesteigerte Zellproliferation (Friedman 2008). Bei der verwendeten Zelllinie LX-2 handelt es sich um Kulturzellen die der aktivierten HSC entsprechen (Xu et al. 2005)

Zur Visualisierung der Expression von α -Smooth-Muscle-Actin erfolgte die immunozytochemische Färbung der fixierten Zellen der Zelllinie LX-2.



LX-2,
 α -Smooth-Muscle-Actin: positiv (+++)

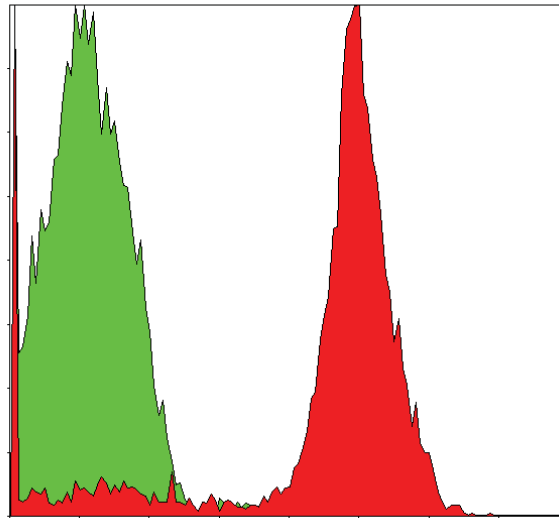
LX-2,
 α -Smooth-Muscle-Actin: Kontrolle: negativ (-)

Abbildung 6.10: Immunzytochemischer Nachweis von α -Smooth-Muscle-Actin an der Zelllinie LX2 (LSAB).

+++ starke Färbung, ++ mittlere Färbung, + leichte Färbung, - keine Färbung

6.2.2 Durchflusszytometrie

Äquivalent zum ADAMTS13-Nachweis erfolgte auch für α -Smooth-Muscle-Actin die Bestimmung eines quantitativen Messwertes mittels Durchflusszytometrie.



LX-2, α -Smooth-Muscle-Actin **Negativkontrolle (10,0%), Messwert (58,0%)**

Abbildung 6.11: Bestimmung des intrazellulären α -Smooth-Muscle-Actin-Antigengehaltes der Kulturlinie LX-2 (Zellzahl: 1×10^6) im Durchflußzytometer nach Permeabilisierung mit Paraformaldehyd (4%) und Triton-X-100 (0,15%).

Es zeigte sich sowohl in der LSAB-Methode als auch in der Durchflusszytometrie für die Zelllinie LX-2 ein stark positives Signal für α -Smooth-Muscle-Actin im Vergleich zur Kontrolle.

6.2.3 Einfluss von TGF- β 1 auf den Aktin Gehalt der Zelllinie LX-2

Die Zugabe von TGF- β 1 führt zu einem leichten Anstieg des α -Smooth-Muscle-Actin Gehaltes der Zellen, der jedoch nicht signifikant ist.

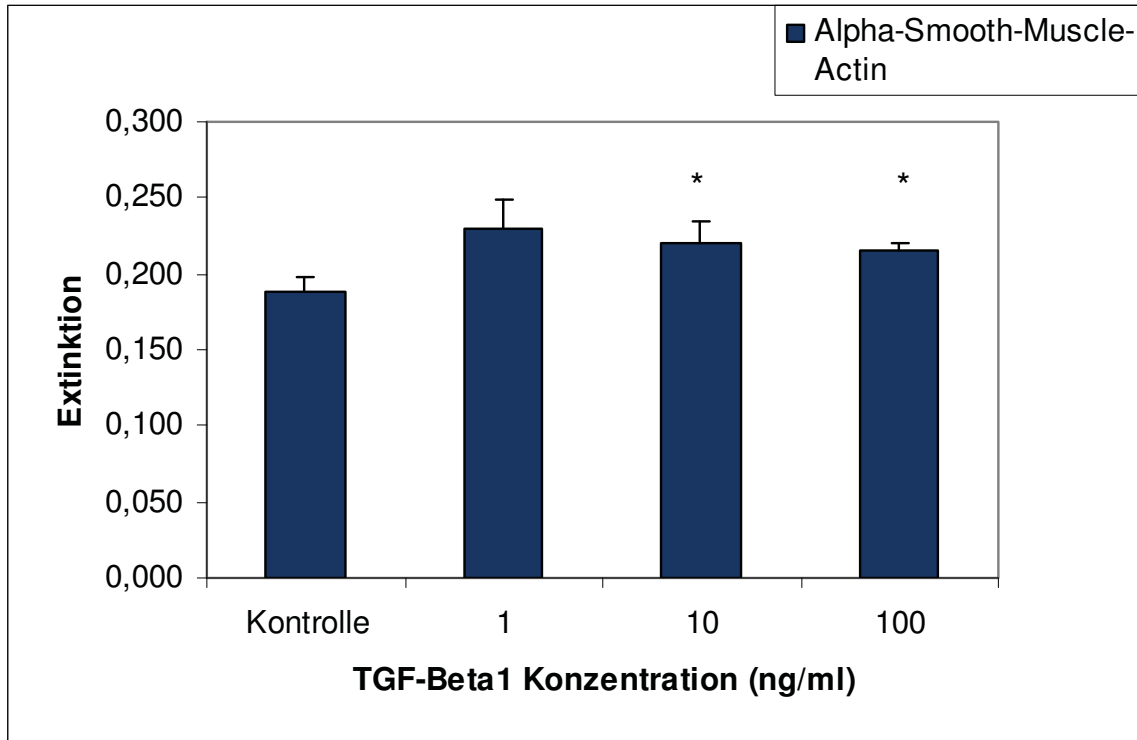


Abbildung 6.12: Einfluss von TGF- β 1 auf den α -Smooth-Muscle-Actin-Antigengehalt (Extinktion) der Zelllinie LX-2 nach 48 h Inkubation ermittelt im Zell-ELISA. (Einsaat: Zellzahl 1×10^5 /ml in eine 96-Well-Platte). Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (* = $p < 0,05$)

Wie im Kapitel 4 („Ziele der Arbeit“) bereits angedeutet wurde der Zusammenhang zwischen dem ADAMTS13- und dem α -Smooth-Muscle-Actin-Antigengehalt näher betrachtet. Dafür wurde täglich über eine Kulturdauer von 6 Tagen jeweils 1×10^6 Zellen der Stellatzelllinie LX-2 im Durchflusszytometer auf den ADAMTS13- und den α -Smooth-Muscle-Actin-Antigengehalt hin untersucht. Dabei zeigte sich ein korrelierter Anstieg des Signals bei beiden untersuchten Antigenen (siehe Abbildung 6.13).

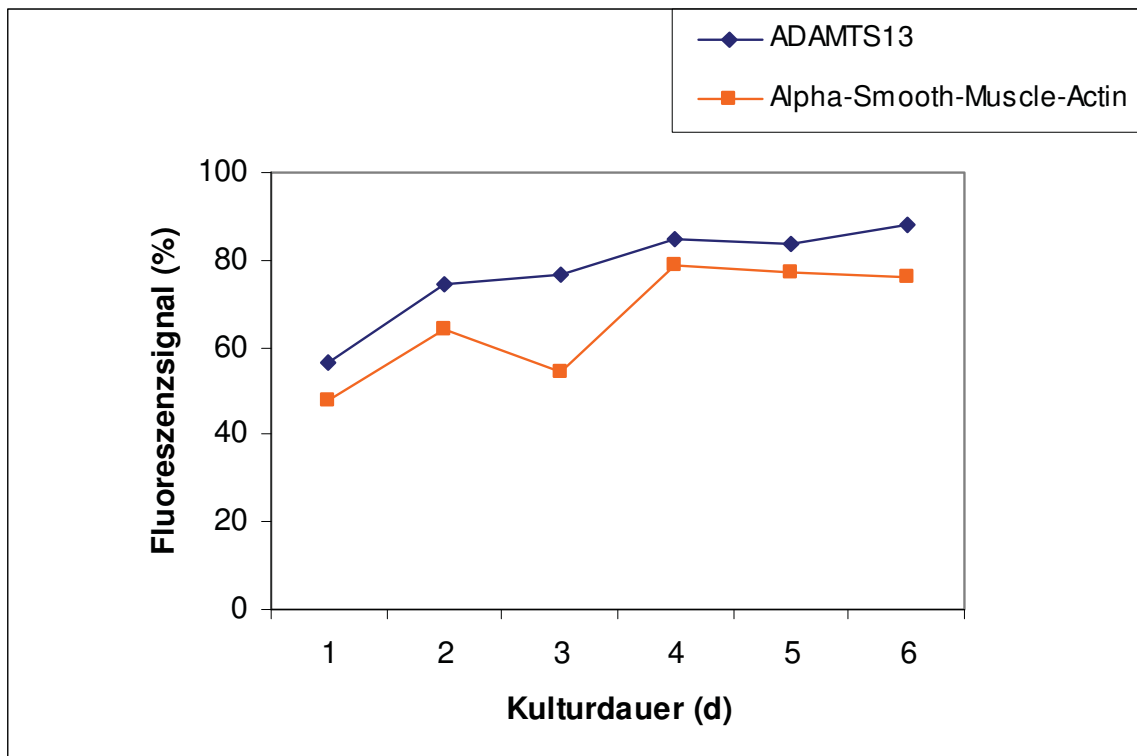


Abbildung 6.13: Bestimmung der Fluoreszenzsignale der Antigene ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin der Zelllinie LX-2 über einen Zeitraum von 6d im Durchflusszytometer (Zellzahl 1×10^6 Zellen) nach Permeabilisierung mit Paraformaldehyd (4%) und Triton-X-100 (0,15%).

6.3 Histaminstimulation

Nachdem der intrazelluläre Nachweis und die Sekretion der vWF-spaltenden Protease gezeigt wurden, war das nächste Ziel eine Beeinflussung der Sekretion des Enzyms zu untersuchen. In verschiedene Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Substrat für ADAMTS13, der von-Willebrand-Faktor, nach Histaminzugabe von den Endothelzellen freigesetzt wird (Hamilton et al. 1987; Turner et al. 2009; Turner et al. 2006). In den darauf folgenden Experimenten bestätigte sich, dass auch die ADAMTS13-Sekretion der hepatischen Zelllinien durch eine Histaminzugabe beeinflusst werden kann.

6.3.1 ADAMTS13-Nachweis im ELISA nach Histaminstimulation

Der Einfluss von Histamin wurde für die Zelllinien LX-2, Hep-G2 EA.hy926 untersucht. Die Zelllinie OVCAR-3 wurde wieder als Negativprobe benutzt. Dafür erfolgte die Messung des ADAMTS13-Antigengehaltes in den Zellkulturüberständen nach Stimulation mit Histamin im ELISA. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien mit einer unterschiedlichen ADAMTS13-Abgabe auf die Inkubation mit

Histamin reagieren. Es zeigte sich eine Abhängigkeit von der Konzentration des Histamins.

Wie in Abbildung 6.14 zu erkennen, konnte für die beiden hepatischen Zelllinien eine signifikante Erhöhung der ADAMTS13-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Histamin gemessen werden. Es bestätigte sich wiederholt, dass Hep-G2 ein bedeutend stärkeres ADAMTS13-Signal zeigte. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente zur Überprüfung der Spezifität der Histaminwirkung hauptsächlich an dieser Zelllinie durchgeführt.

Zur Durchführung eines Vorversuches für die Histaminstimulation an dem Nabelschnurendothel wurde die Endothelzelllinie EA.hy926 verwendet. Die Endothelzelllinie EA.hy926 zeigte keine signifikante Erhöhung des ADAMTS13-Signals nach Histaminzugabe, trotz eines positiven ADAMTS13-Nachweises mittels der Immunzytochemie (LSAB). Die bereits als Negativkontrolle genutzte ovarielle Zelllinie OVCAR-3 zeigte auch nach Histaminstimulation kein ADAMTS13-Signal (ohne Abbildung).

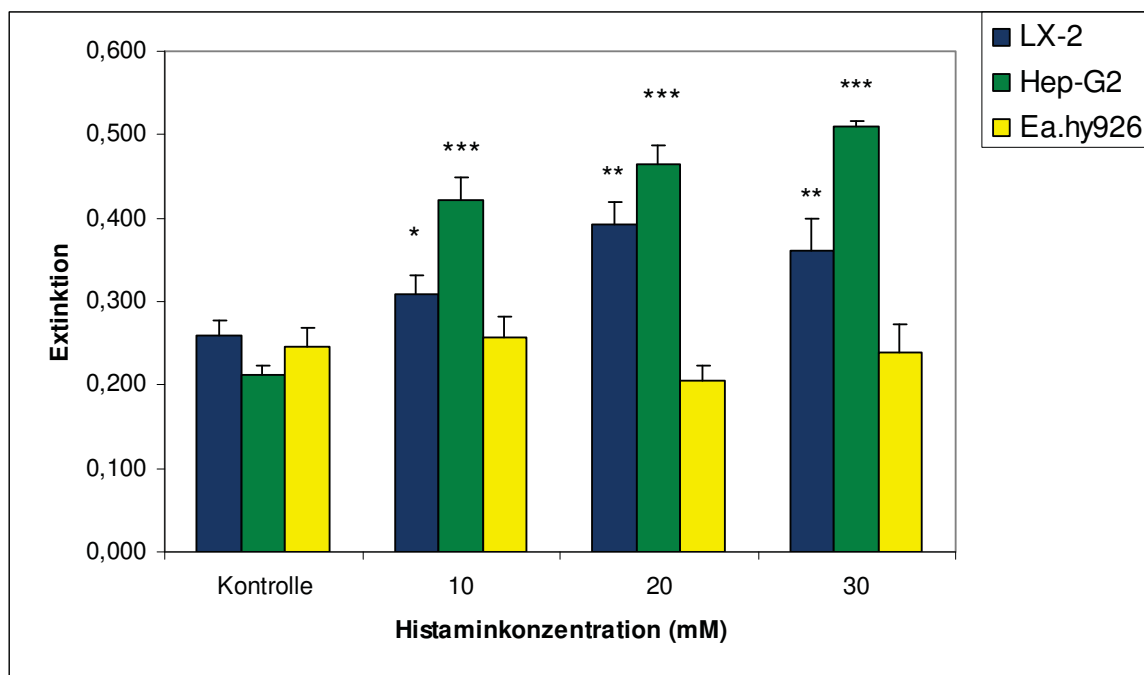


Abbildung 6.14: Bestimmung der ADAMTS13-Antigenkonzentration (Extinktion) nach 20min Histaminstimulation mit ansteigender Konzentration der Zelllinien LX-2, Hep-G2 und EA.hy926 gemessen im ELISA an 1×10^6 Zellen Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle

(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

6.3.2 Auswirkungen von Histamin auf die Zellvitalität

Als nächster Schritt erfolgte die Überprüfung der Auswirkung des Histamins auf die Zellvitalität. Es zeigte sich deutlich, dass ein erheblicher Unterschied in der Vulnerabilität der Zelllinien gegenüber Histamin besteht. Bis zu einer Histaminkonzentration von 10mM ist die Zellvitalität bei beiden hepatischen Zelllinien annähernd gleich hoch (über 90%). Bei höheren Histaminkonzentrationen kommt es zu einem stärkeren Abfall der Zellvitalität der Parenchymzelllinie Hep-G2 im Vergleich zur Sternzelllinie LX-2. Die Endothelzelllinie EA.hy926 reagierte mit dem deutlichsten Abfall der Zellvitalität bereits bei 5mM (ohne Abbildung).

6.3.3 Histaminrezeptoren H1, H2, H3, H4 Nachweis mit LSAB

Die Zelllinien LX-2, Hep-G2 und Ea.hy926 wurden auf das Vorhandensein der verschiedenen Histaminrezeptorsubtypen (H1-H4) mithilfe einer immunzytochemischen Färbung (LSAB) geprüft. Ziel war die Bestimmung einer bevorzugten Expressierung eines Rezeptorsubtypes.

Tabelle 6.1: Nachweis des Histaminrezeptorsubtyps mittels LSAB an den Zelllinien LX-2, Hep-G2 und EA.hy926. Als Kontrolle dienten spezifische Blockierpeptide für den H1 bis H4 Rezeptor

	H1	Kontrolle	H2	Kontrolle	H3	Kontrolle	H4	Kontrolle
LX-2	++	-	+++	+	+++	-	++	-
Hep-G2	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
EA.hy926	+	-	++	-	+	-	++	-

+++ starke Färbung, ++ mittlere Färbung, + leichte Färbung, - keine Färbung

Sowohl LX-2 als auch Hep-G2 zeigten eine mittlere bis starke Expressierung aller vier Histaminrezeptor-Subtypen. Aufgrund dieses Ergebnisses kann die Aussage getroffen werden, dass die Histaminrezeptorsubtypen H1-H4 annähernd gleich stark auf den hepatischen Zelllinien vertreten sind. Die Endothelzelllinie EA.hy926 zeigte eine deutliche geringere Färbung und damit Expressierung der Rezeptoren.

6.4 Prüfung der Spezifität der Histaminstimulation

Mit dem Einsatz ausgewählter Histaminantagonisten und selektiver Histaminagonisten wurde die Spezifität der histaminvermittelten ADAMTS13-Sekretion überprüft. Mit den nachfolgenden Versuchen galt es zu verifizieren, ob die erhöhte Sekretion auf eine unspezifische Permeabilisierung der Zellen zurückzuführen ist oder ein spezifischer histaminvermittelter Signalweg dies bewirkt.

6.4.1 Antagonisierung der Histaminwirkung durch Histaminantagonisten

Die Versuche zur Antagonisierung der Histaminwirkung wurden aufgrund des höheren ADAMTS13-Signals an der Zelllinie Hep-G2 durchgeführt. Als H1-Antagonisten wurden Dimetinden und Diphenhydramin verwendet. Als Vertreter der H2-Antagonisten wurde Ranitidin genutzt. Für die Antagonisierung von H3 und H4 wurde Thioperamid verwendet. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Extinktionswerte in Prozent (bezogen auf die unbehandelte Probe =100%) angegeben.

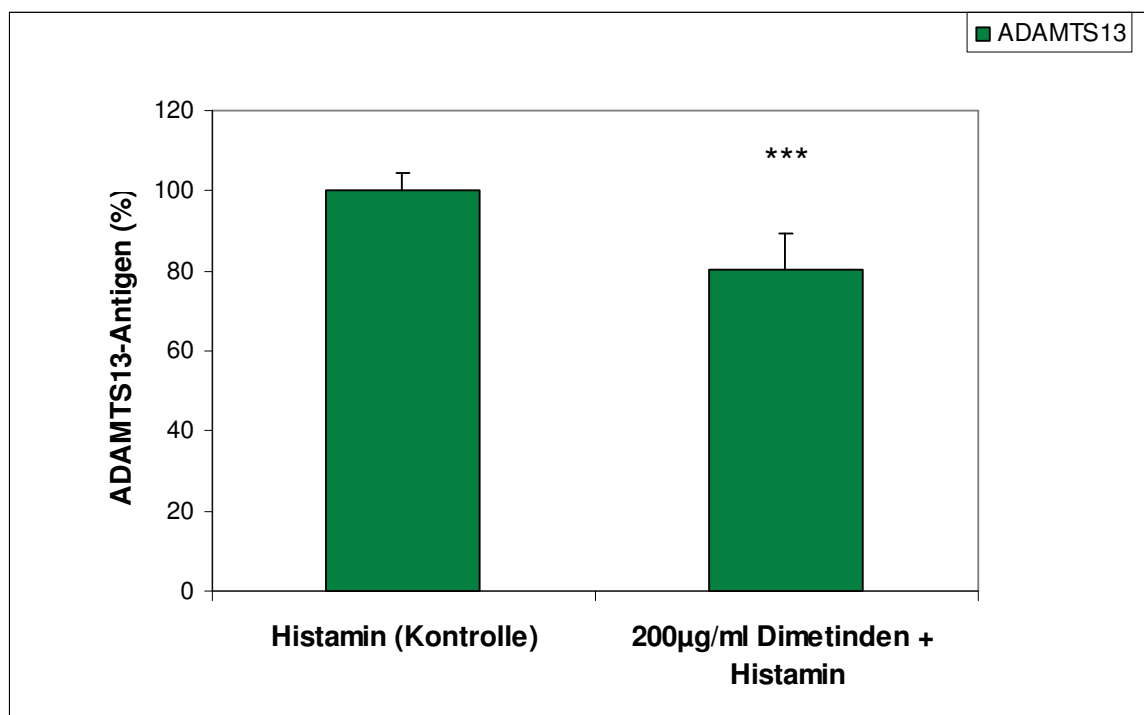


Abbildung 6.15: Antagonisierung von H1 mit Dimetinden (für 30min) vor Histaminstimulation (30mM) der Zelllinie Hep-G2 (in 24-Well-Platte, Zellzahl: 1×10^5 /ml), ADAMTS13-Antigenkonzentration ermittelt im ELISA. Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (***) = $p < 0,001$

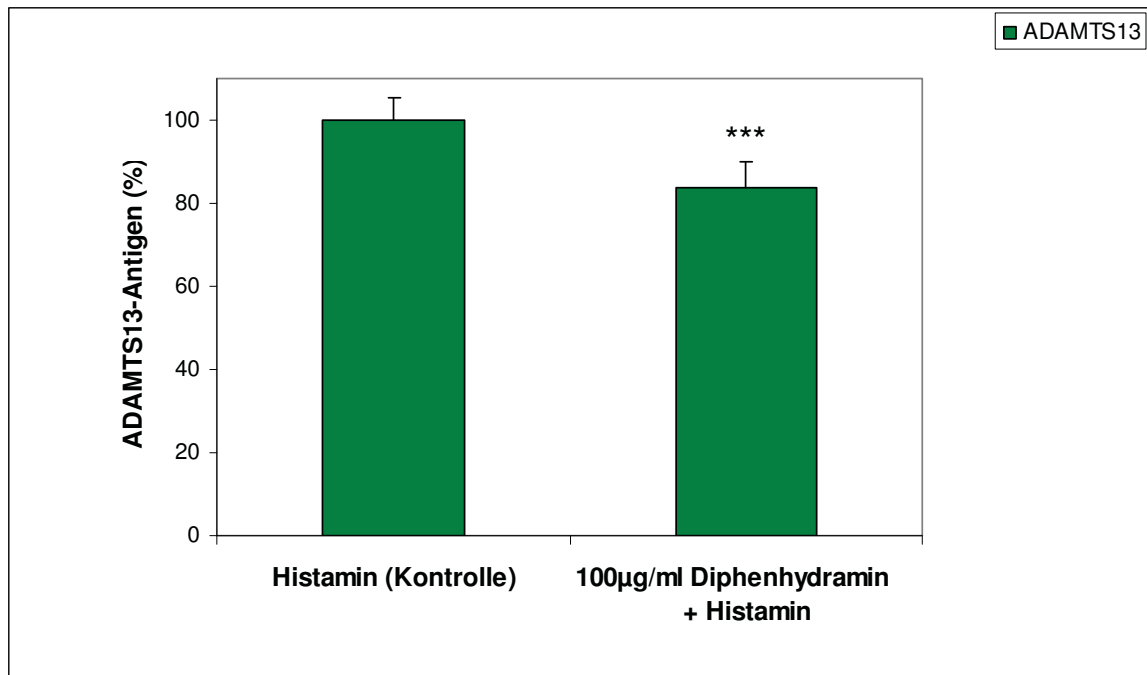


Abbildung 6.16: Antagonisierung von H1 mit Diphenhydramin vor Histaminstimulation (30mM) an der Zelllinie Hep-G2 (in 24-Well-Platte, Zellzahl: 1×10^5 /ml), ADAMTS13-Antigenkonzentration ermittelt im ELISA. (Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle *** = $p < 0,001$).

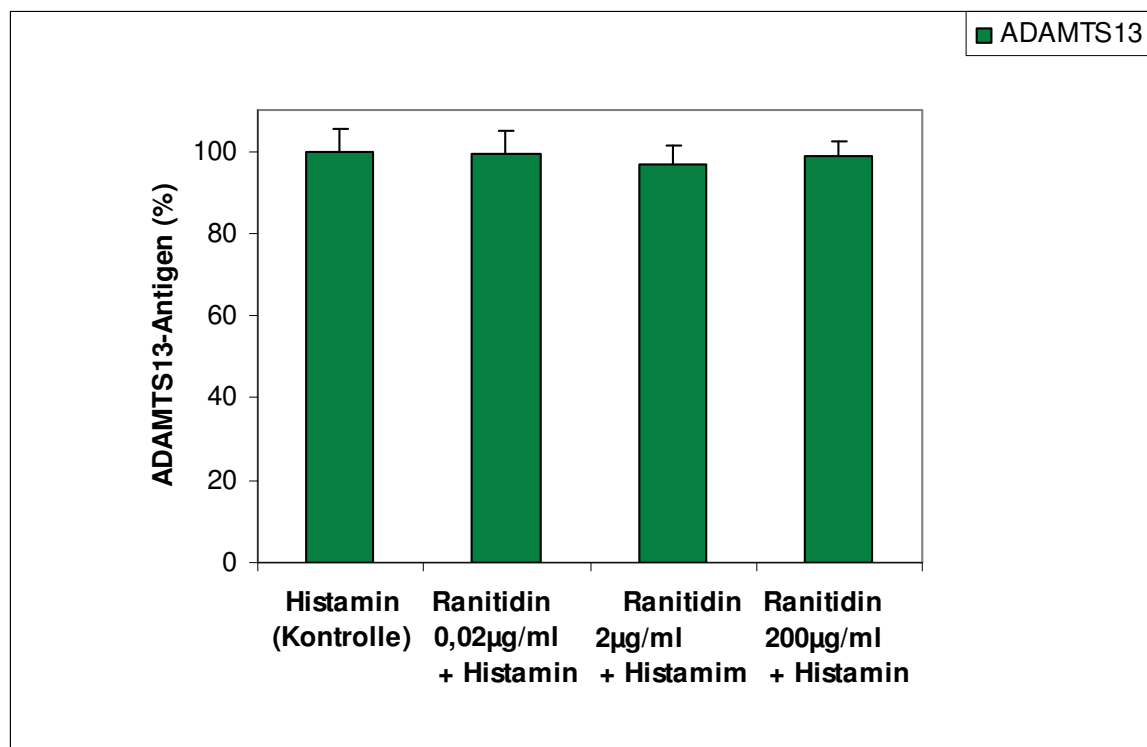


Abbildung 6.17: Antagonisierung von H2 mit Ranitidin vor Histaminstimulation (30mM) an der Zelllinie Hep-G2 (in 24-Well-Platte, Zellzahl: 1×10^5 /ml), ADAMTS13-Antigenkonzentration ermittelt im ELISA.

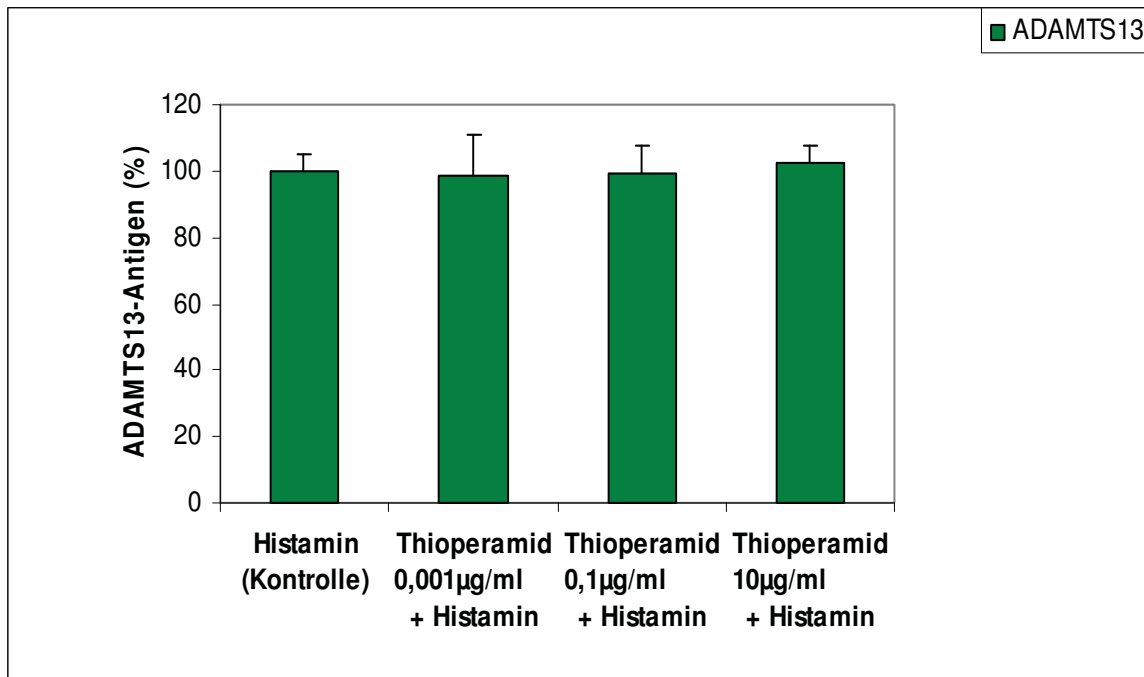


Abbildung 6.18: Antagonisierung von H3 und H4 mit Thioperamid vor Histaminstimulation (30mM) der Zelllinie Hep-G2 (in 24-Well-Platte, Zellzahl: 1×10^5 /ml), ADAMTS13-Antigenkonzentration ermittelt im ELISA.

Eine signifikante Erniedrigung des ADAMTS13-Signals konnte nur bei den H1-Antagonisten Dimetinden und Diphenhydramin nachgewiesen werden. Der H2- und H3/H4-Antagonist zeigte keinen signifikanten Inhibierungseffekt.

6.4.2 Einsatz von selektiven H1 und H2 Histaminagonisten

Zur näheren Eingrenzung des Histaminrezeptorsubtyps wurden die beiden selektiven Histaminagonisten Methylhistaprodifen (H1) und Dimaprit (H2) eingesetzt.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ADAMTS13-Antigenkonzentration nach Stimulation mit dem H1-Agonisten Methylhistaprodifen bei beiden Leberzelllinien. Der H2-Agonist Dimaprit verursachte eine gegenüber der Kontrolle signifikante Erhöhung der ADAMTS13-Sekretion zusätzlich bei LX-2 (siehe Abbildung 6.19).

Betrachtet man diese Aussage zusammen mit den Ergebnissen der Histaminantagonisten, verdeutlicht dieses Resultat eine besondere Rolle des H1-Rezeptors bei der histaminvermittelten ADAMTS13-Abgabe von Hep-G2 und darüber hinaus eine mögliche H2-Rezeptorbeteiligung bei LX-2.

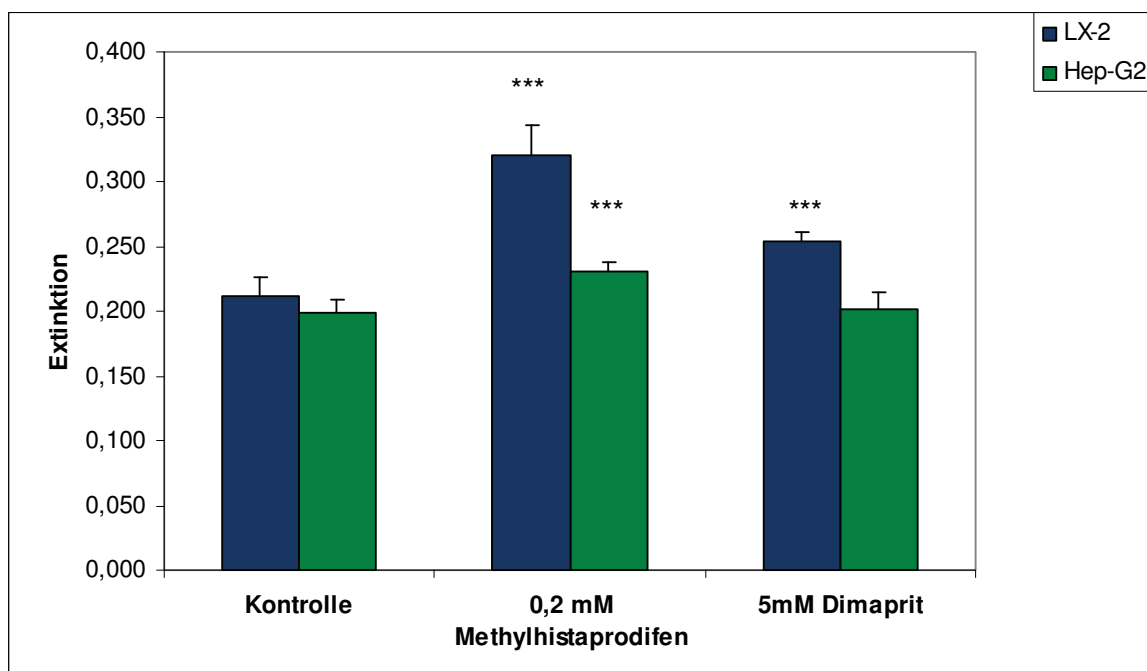


Abbildung 6.19: ADAMTS13-Antigenkonzentration (Extinktion) der Zelllinien LX-2 und Hep-G2 (Zellzahl: 1×10^6) nach Inkubation mit den Histaminagonisten Methylhistaprodifen für H1 und Dimaprit für H2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen im ELISA. (Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle *** = $p < 0,001$).

6.4.3 Hemmung der Signalkaskade durch spezifische Inhibitoren

Histamin vermittelt seine Wirkung auf molekularer Ebene über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Daher sollte mit dem Einsatz verschiedener Signalkaskaden-Inhibitoren die Spezifität der histaminvermittelten ADAMTS13-Abgabe der Zelllinie Hep-G2 über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade bestätigt werden (Hough 2001). Auch dieses Experiment wurde an der Zelllinie Hep-G2 durchgeführt. Es wurden alle Proben einschließlich der Kontrolle mit 20mM Histamin inkubiert. Für die Bestimmung des Inhibierungseffektes der Substanzen wurden die Proben für 30min mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert.

Es wurden folgende Inhibitoren verwendet:

- **AG 1295** (Tyrosinkinaseinhibitor am PDGFR-Rezeptor), Konzentration 1µM
- **SU 11274** (Tyrosinkinaseinhibitor, c-Met), Konzentration: 5µM
- **PD 98059** (Map-Kinaseninhibitor, MEK 1), Konzentration: 10µM
- **BIM I** (Proteinkinase C-Inhibitor), Konzentration: 100nM
- **SL 327** (MEK1 und MEK2 Inhibitor), Konzentration 1µM

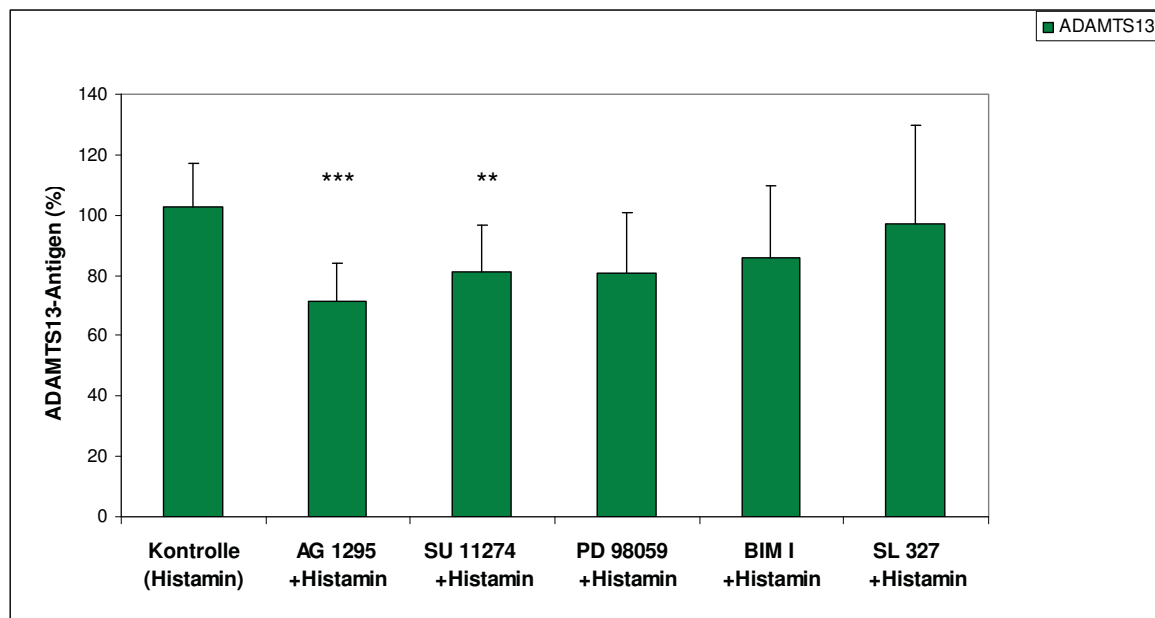


Abbildung 6.20: ADAMTS13-Antigenkonzentration nach Vorinkubation (30min) mit den Signalkaskadeninhibitoren und anschließender Histaminstimulation (20mM) der Zelllinie Hep-G2 (in 24-Well-Platte, Zellzahl: 1×10^5 /ml). (Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Es zeigte sich eine signifikante Inhibierung der histaminvermittelten ADAMTS13-Sekretion nach Vorinkubation mit den Tyrosinkinaseinhibitoren PDGFR AG 1295 und SU 11274. Die Ergebnisse dieser Inhibitor-Experimente deuten auf eine Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und Met hin. Dieser Mechanismus konnte für verschiedenste G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren nachgewiesen werden (Daub et al. 1996, Linseman et al 1995, Fischer et al. 2004). Dies ist eine zusätzliche Bestätigung, dass es sich um einen Rezeptor-medierten Vorgang handelt und nicht um eine passive Abgabe von ADAMTS13.

6.5 Nabelschnurstimulation als Annäherung an ein *In vivo*-Modell

Bei dieser Methode konnte bei drei von sieben Nabelschnüren eine signifikante ADAMTS13-Erhöhung nachgewiesen werden.

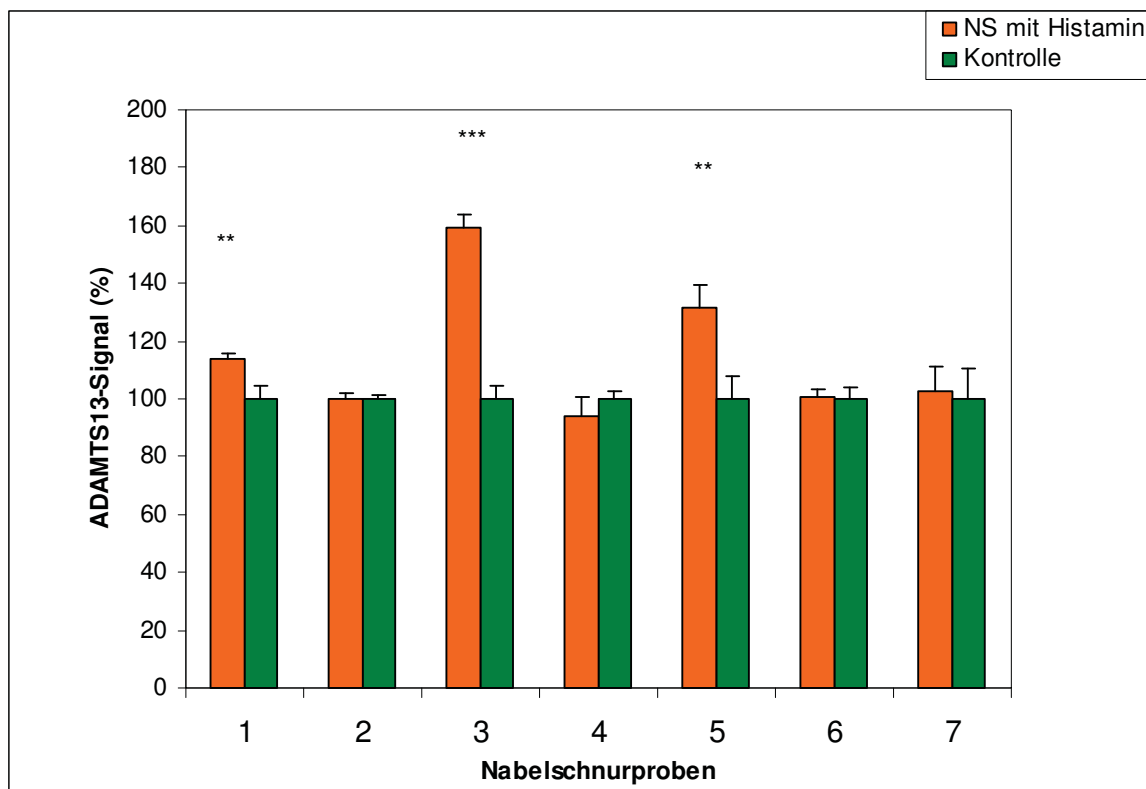


Abbildung 6.21: Bestimmung der ADAMTS13-Antigenkonzentration nach 20min Inkubation der Nabelschnur (NS) mit Histamin (20mM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ADAMTS13 Signal ermittelt im ELISA.

Die Nabelschnurstimulation wurde wie unter 5.8. beschrieben durchgeführt. Es wurden sieben Nabelschnüre (Länge ca. 10cm) über ein Schlauchsystem sondiert und das Histamin bzw. DMEM direkt in die Nabelschnurvene injiziert und ebenfalls für 20min inkubiert. Damit konnte garantiert werden, dass das Histamin nur mit den

Endothelzellen der Nabelschnurvene in Kontakt kam und damit nur diese Zellen spezifisch stimuliert wurden.

Bei dieser Methode konnte bei drei von sieben Nabelschnüren eine signifikante ADAMTS13-Erhöhung nachgewiesen werden.

Es wurde die prozentuale Erhöhung des Signals gegenüber der unstimulierten Vergleichsprobe (100%) erfasst und in Abbildung 6.21 dargestellt.

Tabelle 6.2.: Zusammenfassung der bearbeiteten Nabelschnüre

	Kontrolle	NS mit Histamin
Mittelwert	99,97%	114,47%
Stand.Abw.	0,11	23,23
p-Wert		0,150

In der Zusammenfassung aller bearbeiteten Nabelschnüre zeigt sich ein gering erhöhtes jedoch nicht signifikantes ADAMTS13 Signal im Vergleich zur nicht stimulierten Umbilicalvene.

6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte für die beiden hepatischen Zelllinien Hep-G2 und LX-2 eine hohe und für die Endothelzelllinie EA.hy926 eine mittlere intrazelluläre ADAMTS13-Antigen-Expression nachgewiesen werden. Beide hepatischen Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Sekretionseigenschaften in der Zellkultur untersucht. Es zeigte sich, dass die hepatische Stellatzelllinie und die hepatische Parenchymzelllinie kontinuierlich ohne externe Stimuli ADAMTS13 in das Zellkulturmedium sekretieren. Die Stellatzelllinie zeigt dabei über den gesamten Beobachtungszeitraum eine höhere ADAMTS13-Sekretionsrate. Für die Stellatzelllinie LX-2 erfolgte der Nachweis des charakteristischen Markers α -Smooth-Muscle-Actin mittels Immunzytochemie und Durchflusszytometrie. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Parenchymzelllinie Hep-G2 nach TGF- β 1 Zugabe zu einer verstärkten Expression von ADAMTS13 kommt. Für die Stellatzelllinie LX-2 konnte eine Zunahme der Expression von α -Smooth-Muscle-Actin gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Die Bestimmung von ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin an der Zelllinie LX-2 zeigte einen korrelierten Anstieg der beiden Proteine. Die Kokultur der beiden Zelllinien zeigte keinen Einfluss auf die ADAMTS13-Antigenkonzentration.

Die hepatischen Zelllinien LX-2 und Hep-G2 erhöhten signifikant die ADAMTS13-Ausschüttung in den Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Histamin. Für die Endothelzelllinie EA.hy926 konnte dies nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien bezüglich der zugeführten Histaminmenge, was sich in der verminderten Zellvitalität bemerkbar machte.

Mithilfe der Immunzytochemie erfolgte der Nachweis der Expression aller vier Histaminrezeptorsubtypen an den Leberzelllinien und der Endothelzelllinie. Die Versuche zur Charakterisierung der Histaminstimulation deuten darauf hin, dass der Histaminrezeptorsubtyp H1 für die stimulierte ADAMTS13-Abgabe der hepatischen Zelllinie Hep-G2 verantwortlich sein könnte. Dies begründet sich zum einen in der Möglichkeit der ADAMTS13-Signalinhibierung nach vorheriger Inkubation mit den H1-Antagonisten (Dimetinden, Diphenhydramin) und zum anderen aufgrund einer signifikanten Erhöhung des ADAMTS13-Signals nach Zugabe des selektiven H1-Agonisten Methylhistaprodifen. Darüber hinaus ist eine Beteiligung des H2-Rezeptors an der histaminvermittelten ADAMTS13-Abgabe der Stellatzelllinie LX-2

denkbar, da diese nach Inkubation mit Dimaprit (H₂-Agonist) eine signifikante Erhöhung der ADAMTS13-Antigenkonzentration zeigte. Die Ergebnisse der Versuche zur Identifizierung einer bestimmten Signalkaskade deuten auf eine Histaminrezeptor-vermittelte Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und Met hin. Als Annäherung an ein *In vivo*-Modell wurden Nabelschnurvenen mit Histamin perfundiert. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur Endothelzellkultur ein signifikanter Anstieg des ADAMTS13-Signals nach Stimulation bei ca. der Hälfte der bearbeiteten Nabelschnüre.

7 Diskussion

In den durchgeführten Experimenten konnte eine hohe intrazelluläre Konzentration der von-Willebrand-Faktor-spaltenden Protease ADAMTS13 an den beiden hepatischen Zelllinien LX-2 und Hep-G2 gezeigt werden. Der immunozytochemische Nachweis wurde mit zwei unterschiedlichen polyklonalen und einem monoklonalen anti-ADAMTS13-Antikörper durchgeführt, welche ein annähernd gleich hohes ADAMTS13-Signal und intrazelluläres Verteilungsmuster zeigten. Es präsentierte sich eine homogene Verteilung von ADAMTS13 im Zytoplasma, so dass keine Speicherung in bestimmten Organellen oder Vesikeln erkennbar war. Der Ausschluss der Lokalisation von ADAMTS13 an der Zellmembran erfolgte in der Durchflusszytometrie, welche ebenfalls ein starkes ADAMTS13-Signal im Vergleich zur Kontrolle an beiden hepatischen Zelllinien (LX2: 56,7%, Hep-G2: 62,7%) bestätigte. Da eine Permeabilisierung der Zellmembran Voraussetzung zur Messung eines ADAMTS13-Signals war, spricht dies für eine intrazelluläre Expression des Enzyms. Dies steht im Einklang mit der aktuellen Literatur, die ebenfalls eine intrazelluläre Expression des Enzyms beschreibt und die Leber als Hauptsyntheseort ansieht (Geetha et al. 2009).

Neben den hepatischen Stellatzellen (Zelllinie LX-2), die als Hauptsyntheseort in der Leber gelten (Uemura et al. 2005; Zhou et al. 2005), konnte auch an den Parenchymzellen der Linie Hep-G2 eine deutliche ADAMTS13-Expression nachgewiesen werden. Betrachtet man die Tatsache, dass der Anteil der hepatischen Stellatzellen an der Gesamtanzahl der Leberzellen nur etwa 5-8% beträgt, ist es gut denkbar, dass auch die Parenchymzellen einen bedeutenden Beitrag zur ADAMTS13-Synthese und -sekretion im Körper leisten (Reynaert et al. 2002). Von besonderer Bedeutung könnte dies im Rahmen der Entstehung einer Leberfibrose sein, bei der es als initialen Schritt zur Transformation der Stellatzellen in einen dem Myofibroblasten ähnlichen Zelltyp kommt (Friedman 2008) und dies mit einer eingeschränkten ADAMTS13-Sekretion der Stellatzellen einhergeht (Kume et al. 2007). Auch in anderen Zellarten wie den Podozyten der Niere (Manea et al. 2007) und den Endothelzellen (Shang et al. 2006; Turner et al. 2006) konnte ebenfalls eine Expression der aktiven Protease nachgewiesen werden. Man könnte vermuten, dass eine besonders hohe ADAMTS13-Expression in den Organen bzw. Geweben vorliegt, die einer ausgeprägten hämodynamischen Belastung mit hohen

Strömungswiderständen und Scherkräften ausgesetzt sind. Dies könnte die Synthese und Sekretion der von-Willebrand-Faktor-spaltenden Protease in der Leber, der Niere und dem Endothel erklären. Darüber hinaus wurde der ADAMTS13-RNA-Nachweis in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Lunge, Milz, Skelettmuskel, Ovar und Pankreas beschrieben (Plaimauer et al. 2002, Levy et al. 2001). Die Funktion der jedoch geringen Expression in diesen Organen ist noch weitgehend ungeklärt.

Nach dem intrazellulären Nachweis des zu untersuchenden Enzyms, konnte auch eine kontinuierliche Sekretion von ADAMTS13 für beide hepatischen Zelllinien in den Zellkulturüberstand gezeigt werden. Betrachtet man die ADAMTS13-Sekretion bezogen auf die Zellzahl zeigt die Stellat-Zelllinie eine höhere ADAMTS13-Sekretionsleistung. Dies bestätigt die herausragende Rolle der hepatischen Stellatzellen bei der ADAMTS13-Sekretion (Uemura et al. 2005; Zhou et al. 2005). Darüber hinaus zeigte auch die hepatische Parenchymzelllinie eine kontinuierliche ADAMTS13-Abgabe.

Aufgrund des direkten Zellkontaktes und der Fähigkeit der Interaktion über Zytokine und Mediatoren der Parenchymzellen und Stellatzellen im physiologischen Lebergewebeaufbau wurde eine gegenseitige Beeinflussung auch für das Enzym ADAMTS13 überprüft (Friedman 2008). Die Kokultivierung der hepatischen Zelllinien, die während dieser Kulturform einen Signalaustausch vornehmen konnten, zeigte entgegen den Erwartungen keinen steigernden Einfluss auf den ADAMTS13-Gehalt der jeweiligen Zellen. Bei der parallelen Bestimmung von ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin zeigte sich ein korrelierter Anstieg des Signals bei beiden untersuchten Antigenen. Zu dem gleichen Ergebnis führte auch ein Leberschädigungs-Tiermodell an Ratten von 2009, an denen experimentell eine Cholestase und eine Steatosis hepatis generiert wurden. Es konnte in dem Rattenlebergewebe eine direkte lineare Korrelation zwischen der ADAMTS13- und der α -Smooth-Muscle-Actin mRNA nachgewiesen werden (Watanabe et al. 2009). Ein ähnliches Ergebnis erzielten Niiya et al. 2006, die nach Schädigung von Leberzellen mit Tetrachlormethan ebenfalls einen starken ADAMTS13-mRNA Anstieg zeigen konnten. Dies führt zu der These, dass eine Aktivierung der Stellatzelllinie LX-2 mit einem Anstieg der ADAMTS13-Konzentration einhergeht. Dies widerspricht der Annahme, dass eine Schädigung und Transformation der hepatischen Stellatzellen zwangsläufig mit einem Abfall der ADAMTS13-Expression einhergeht. Inwiefern ein Expressionsanstieg sich auch auf

die ADAMTS13-Plasmaaktivität ausübt oder welche physiologische Bedeutung dieser mRNA-Anstieg innehat, ist eine noch ungelöste Fragestellung (Niiya et al. 2006, Watanabe et al. 2009). Der gemeinsame Anstieg von ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin im durchgeführten Experiment könnte daher mit einer Schädigung der LX2-Zellen aufgrund von suboptimalen Kulturbedingungen bei Überschreitung des optimalen Passagierzeitpunktes (3.-4. Tag) der Zellen über den 6-tägigen Kulturzeitraum zu erklären sein. Aufgrund der eingeschränkten Kulturbedingungen ab dem 3. Kulturtag (Nährstoffe des Mediums aufgebraucht, Zellwachstum durch Konfluenz der Zellen eingeschränkt) könnte eine beginnende Transformation mit Anstieg des α -Smooth-Muscle-Actin Gehaltes der Grund dafür sein. Bei der mikroskopischen Betrachtung einer „überalterten“ LX2-Zellkultur fiel wiederholt eine Veränderung des Wachstumsmusters vom regelmäßigen Monolayer zu einer strangförmigen, septierten Anordnung auf. Dies könnte das visuelle Korrelat für eine Transformation darstellen. Ein Erklärungsansatz verfolgt die Rolle von ADAMTS13 als Protease im Rahmen der Gewebemodulation der Leberregeneration und Umwandlung während der Leberfibrose und nach anderen Schädigungen (Niiya et al. 2006). Die vorliegenden Ergebnisse der Dissertation könnten eine Regulation der ADAMTS13-Synthese im Rahmen der Transformation zwischen den hepatischen Zellarten verdeutlichen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine Möglichkeit gesucht diesen Transformationsprozess zu beeinflussen. Eine geeignete Substanz konnte mit dem Zytokin TGF- β 1 gefunden werden. TGF- β 1 wird eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Leberfibrose zugeschrieben (Bedossa et al. 1995). Als inflammatorisches Zytokin wird es in diesem Zusammenhang von den hepatischen Stellatzellen autokrin (selbst stimulierend) und parakrin (Wirkung auf Nachbarzellen) synthetisiert und stellt für die HSC einen Reiz zur Transformation zum Myofibroblasten dar (Friedman et al. 2008). Es konnte experimentell ein TGF- β 1 Anstieg in *in vitro* generierten Leberfibrosen und *in vivo* nachgewiesen werden (Castilla et al. 1991, Gressner et al. 2002).

Im Zell-ELISA konnte nach TGF- β 1 Inkubation eine erhöhte intrazelluläre Antigenkonzentration von ADAMTS13 für die Parenchymzelllinie Hep-G2 gezeigt werden. Eine Auswirkung auf den ADAMTS13-Gehalt an der Stellatzelllinie LX-2 konnte entgegen der Erwartung nicht nachgewiesen werden, dafür aber eine erhöhte Expression von α -Smooth-Muscle-Actin. Dies könnte ein Hinweis für die Regulation

der ADAMTS13-Sekretion zwischen den hepatischen Zellarten sein. Im Rahmen einer toxischen Leberzellschädigung oder einer Fibrose nach chronischer Entzündung könnte eine gesteigerte Ausschüttung von TGF- β 1 ein Signal an die Parenchymzellen senden, die Expression von ADAMTS13 zu erhöhen. Dieser Signalweg würde den ADAMTS13-Bedarf bei eingeschränkter Synthese der hepatischen Stellatzellen mittels einer gesteigerten parenchymatösen ADAMTS13-Synthese ausgleichen und damit den physiologischen Blutfluss Aufrecht erhalten (siehe Abb. 7.1).

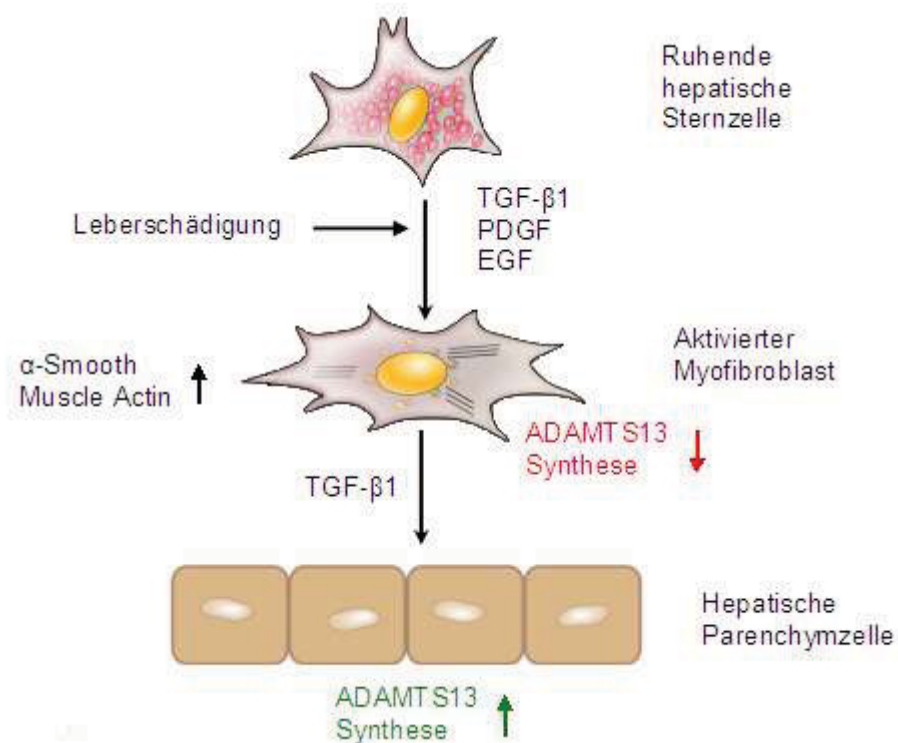


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung zur Hypothese der Regulation der ADAMTS13-Synthese mittels TGF- β 1, modifiziert nach Reynaert et al. 2002 und Friedman 2008

In vorangegangenen Versuchen konnte der Nachweis von α -Smooth-Muscle-Actin immunozytochemisch und durchflusszytometrisch für die Zelllinie LX-2 erbracht werden.

Im anknüpfenden Abschnitt der Arbeit wurde das erhöhte ADAMTS13-Signal im Zellkulturüberstand nach Zugabe des inflammatorischen Mediators Histamin untersucht. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass eine Histaminzugabe an Endothelzellen zu einer Ausschüttung von ultrlangen vWF-Multimeren führt (Hamilton et al. 1987; Turner et al. 2006). Die Histaminstimulation zeigte dabei einen dosisabhängigen Anstieg des intrazellulären Calciums und des von-Willebrand-Faktors. Beide Effekte konnten mit dem H1-Antagonisten Pyrilamin inhibiert werden,

jedoch nicht mit dem H₂-Antagonisten Cimetidin. Die Ergebnisse der Arbeit von Hamilton et al. führten zur der Annahme der Existenz eines humanen, endothelialen H₁-Rezeptors, welcher nach Histaminstimulation ultralange vWF-Multimere sekretiert (Hamilton et al 1987).

Dieser Sachverhalt führte zu der eigenen Überlegung, eine Histaminbehandlung der hepatischen Zelllinien bewirke eine Sekretionssteigerung der vWF-spaltenden-Protease ADAMTS13. An den hepatischen Zelllinien Hep-G2 und LX-2 und der endothelialen Zelllinie EA.hy926 wurde diese Fragestellung überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung des ADAMTS13-Antigen-Signals der Leberzelllinien LX-2 und Hep-G2 nach Histaminzugabe. Dabei erwies sich, dass für die Parenchymzelllinie Hep-G2 das stärkere ADAMTS13-Signal nach Histaminexposition nachgewiesen werden konnte. Die Histaminstimulation führte dagegen bei der Endothelzelllinie zu keiner Erhöhung des ADAMTS13-Signals, trotz eines positiven ADAMTS13-Nachweises mittels der Immunzytochemie. Ein ähnliches Ergebnis erzielte auch die Arbeit von Turner et al 2009, welche die histaminvermittelte ADAMTS13-Stimulation von venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVECS) untersuchten und dabei ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen histaminstimulierten und unstimulierten Zellen fanden.

Es wurde eine immunzytochemische Färbung für die Histaminrezeptorsubtypen H₁, H₂, H₃ und H₄ durchgeführt mit dem Ziel, den dominant exprimierten Histaminrezeptorsubtyp in den hepatischen Zelllinien zu identifizieren. Es zeigte sich, dass alle vier Subtypen gleichermaßen von den hepatischen Zelllinien exprimiert werden. Die Endothelzelllinie EA.hy926 präsentierte eine deutlich geringere Expression des H₁-Rezeptors in der Immunzytochemie und im Histaminstimulationsversuch keine signifikante ADAMTS13-Ausschüttung. Auch dies stützt die These einer H₁-vermittelten ADAMTS13-Ausschüttung. Im anschließend durchgeführten Alamar Blue Assay zeigte sich eine variable Zellvitalität mit steigender Histaminkonzentration, wobei LX-2 resistenter gegenüber der Histamineinwirkung war. Dieses Ergebnis musste zu der kritischen Frage führen, ob es sich bei der histaminvermittelten ADAMTS13-Sekretion um einen spezifischen Signalweg oder um eine unspezifische Permeabilisierung der Zellmembran und somit einer passiven Freisetzung von ADAMTS13 handelte. Bei einer Histaminkonzentration von 10mM lag die Vitalität der beiden hepatischen Zelllinien über 90%. Allerdings zeigen sie unterschiedlich hohe ADAMTS13-Signale im ELISA

(siehe Abbildung 6.16). Dieser Wert verdeutlicht am besten die histaminvermittelte ADAMTS13-Abgabe, da bei dieser Konzentration von einer weitgehend unbeeinflussten Zellvitalität ausgegangen werden kann. Ab 20mM kam es zu einer erheblichen Abnahme der Zellvitalität, welche bei 30mM für LX-2 68% und für Hep-G2 nur noch 31% betrug. Eine histamin-bedingte Schädigung der Zellmembran und die daraus folgende Entleerung des Zytosols (inkl. Intrazellulären ADAMTS13) kann bei einer Einschränkung der Zellvitalität nicht ausgeschlossen werden. Daher waren weitere Experimente zur Überprüfung der Spezifität und Charakterisierung der gesteigerten ADAMTS13-Sekretion durchzuführen.

Die Versuche zur Inhibierung des Histamins mittels Histaminantagonisten wurden aufgrund des höheren ADAMTS13-Signals an der Zelllinie Hep-G2 durchgeführt. Es zeigte sich eine partielle Inhibierung des ADAMTS13-Signals nur mit den H1-Antagonisten Dimetinden auf 80,10% und Diphenhydramin auf 83,91% (bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ohne Antagonist = 100%). Die Benutzung von Histaminkonzentrationen über 10mM und deren Einfluss auf die Zellvitalität könnte die Erklärung für die partielle Inhibierung der Histaminwirkung nach Inkubation mit den Antagonisten und Inhibitoren sein.

Da nur eine partielle Inhibierung nachgewiesen werden konnte, wurden die selektiven Histaminagonisten Methylhistaprodifen (H1) und Dimaprit (H2) eingesetzt. An beiden hepatischen Zelllinien konnte ein signifikant erhöhtes ADAMTS13-Signal nach Inkubation mit dem H1-Agonisten Methylhistaprodifen im ELISA gemessen werden, wobei LX-2 ein deutlich stärkeres Signal zeigte. Darüber hinaus konnte für LX-2 auch ein deutlich geringeres aber signifikantes ADAMTS13-Signal nach Inkubation mit dem spezifischen H2 Agonisten Dimaprit festgestellt werden, für Hep-G2 galt dies nicht.

Histaminrezeptoren vermitteln ihre Wirkung auf molekularer Ebene über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Zur weiteren Überprüfung der Hypothese einer histaminvermittelten ADAMTS13-Ausschüttung sollten nun spezifische Signalkaskadeninhibitoren für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eingesetzt, die ebenfalls zu einer Reduktion des ADAMTS13-Signals führen sollten.

Der Begriff der Transaktivierung bezeichnet dabei die Aktivierung eines Rezeptors aufgrund einer vorangegangenen Stimulation eines anderen Rezeptors. Dieser Zusammenhang besteht z.B. bei der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen mittels G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Wetzker et al. 2003). Nach der Bindung eines

Agonisten an den Tyrosinkinase-Rezeptor und dessen Aktivierung beginnt die Tyrosinkinase im Inneren der Zelle eigene Tyrosinreste zu phosphorylieren, was man als Autophosphorylierung bezeichnet. Diese phosphorylierten Tyrosinreste phosphorylieren wiederum andere zelluläre Signalproteine, die die Effekte des gebundenen Agonisten in das Zellinnere weiterleitet. Diesen Mechanismus findet man bei vielen Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGFR (Platelet-derived-growth-factor), EGF (Epidermal-Growth-Factor), NGF (Nerve-Growth-Factor) und Insulin. Die Regulation der G-Proteine erfolgt durch die Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) oder GDP (Guanosindiphosphat) an die heterotrimeren G-Proteine, wobei die GDP-gebundene Form inaktiv ist. Kommt es zur Bindung von GTP wird der G-Protein-Komplex instabil und es kommt zur Konformationsänderung und Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Diese aktivierten Untereinheiten sind für die weitere Signaltransduktion verantwortlich. Ein Beispiel für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind wie bereits erwähnt die Histaminrezeptorsubtypen H1-H4 (Hough 2001). Die erste Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen fand man in der G-Protein gekoppelten Aktivierung des Epidermal-Growth-Factors (EGF) (Daub et al. 1996). Auch für andere Rezeptortyrosinkinasen konnte eine G-Protein gekoppelte Transaktivierung gezeigt werden unter anderen für PDGFR (Linseman et al. 1995) und Met (Fischer et al. 2004), deren Hemmstoffe den signifikanten Inhibierungseffekt bei der histaminvermittelten ADAMTS13-Sekretion zeigten.

Es zeigte sich eine signifikante jedoch nicht komplette Inhibierung des ADAMTS13-Signals nach Vorinkubation mit den beiden Tyrosinkinaseinhibitoren PDGFR AG 1295 auf 71,4% und SU 11274 auf 81,2% an der Parenchymzelllinie Hep-G2. Die Ergebnisse deuten auf eine histaminrezeptor-vermittelte Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und Met hin. Dieser Mechanismus ist für verschiedenste G-Proteingekoppelte Rezeptoren beschrieben (Daub et al. 1996, Linseman et al. 1995, Fischer et al. 2004). Dies ist eine zusätzliche Bestätigung, dass es sich um einen Rezeptor-medierten Vorgang handelt und nicht nur um eine passive Abgabe von ADAMTS13.

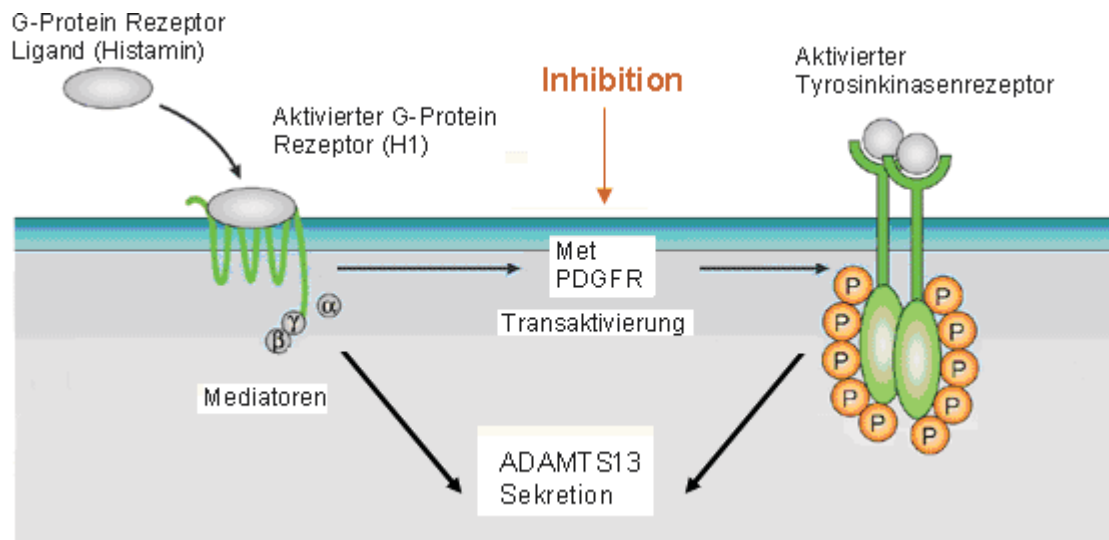


Abbildung 7.2: Schematische Darstellung zur Hypothese der G-Protein-vermittelten Transaktivierung der Tyrosinkinasen PDGFR und Met, Quelle: modifiziert nach Wetzker et al 2003.

Der Mediator Histamin spielt eine herausragende Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung. Im Verlauf einer Entzündung kommt es zur Erhöhung so genannter Akute Phase Proteine wie Fibrinogen, α 1-Antitrypsin oder dem C-reaktiven-Protein, die auch diagnostisch zur Überwachung einer Entzündungsreaktion genutzt werden können. Ebenfalls zu den Akute Phase Proteinen wird der von-Willebrand-Faktor gezählt (Pottinger et al. 1989), welcher während einer Entzündung deutlich über das normale Maß hinaus ansteigen kann. Daher wäre es denkbar, dass die histaminvermittelte ADAMTS13-Sekretion ein natürlicher Schutzmechanismus gegen vermehrt anfallende, große vWF-Multimere während einer Entzündung ist und somit eine schnelle Mobilisierung der Protease ADAMTS13 gewährleistet. Dabei könnte es analog einer Verbrauchskoagulopathie, die zu einem gesteigerten Thrombozytenverbrauch führt, auch zu einem gesteigerten Verbrauch von ADAMTS13 kommen. Dies könnte die sinkenden ADAMTS13-Plasmaspiegel in einer Vielzahl pathologischer Situationen wie Sepsis, Leberzirrhose, Urämie oder dem postoperativen Zustand erklären.

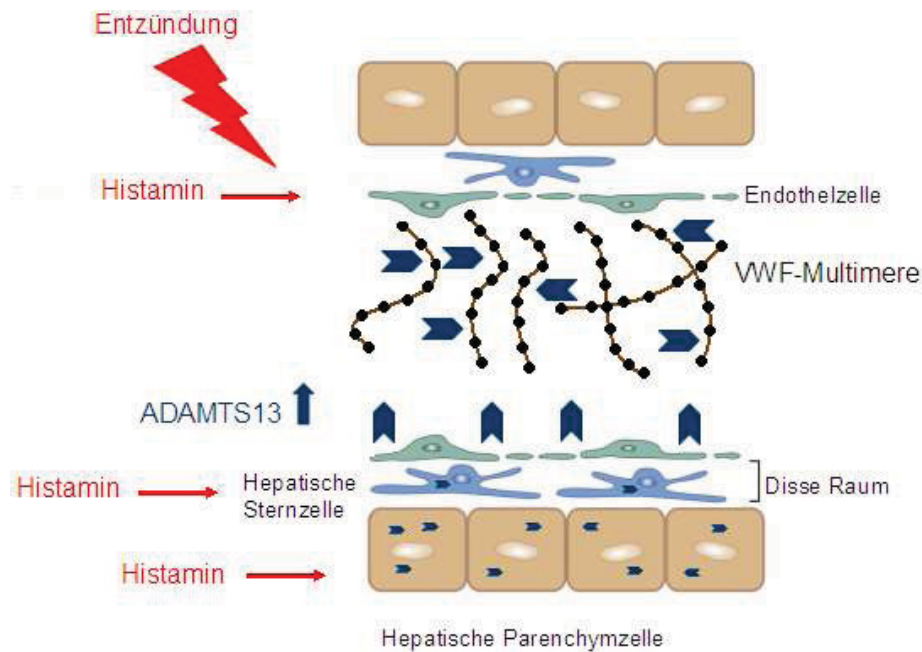


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung der histaminvermittelten ADAMTS13- und vWF-Sekretion im Rahmen einer Entzündung, nach Reynaert et al. 2002 modifiziert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde als Annäherung an ein *In vivo*-Modell die Nabelschnurvene von intakten Nabelschnüren mit Histamin perfundiert. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur *in vitro* untersuchten Endothelzellkultur ein signifikanter Anstieg des ADAMTS13-Signals nach Stimulation bei ca. der Hälfte der bearbeiteten Nabelschnüre (n=7 Gesamt, n=3 signifikante Erhöhung des ADAMTS13 Signals) im Vergleich zur Kontrolle. Da mit dem Schritt von der Zellkultur zu einem komplexen Zellverband wie zum Beispiel einer Nabelschnurvene viele unbekannte Faktoren hinzukommen, ist diese Versuchsanordnung schwierig zu standardisieren. Es traten dabei Schwankungen in der Größe und dem Zustand der Nabelschnüre sowie dem Zeitpunkt nach Abnabelung oder anatomischer Beschaffenheit der Nabelschnüre auf. Dies könnte ein wesentlicher Faktor der ungenügenden Reproduzierbarkeit der ADAMTS13 Sekretion in der humanen Nabelschnur sein. Die Interpretation des ADAMTS13-Signals nach Stimulation ist daher nicht leicht zu erstellen. Es ist die Tendenz erkennbar, dass die ADAMTS13-Ausschüttung nach Histaminkontakt auch im komplexen Gewebeverband möglich ist. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich dabei um einen physiologischen Prozess handeln könnte.

7.1 Klinischer Ausblick

Eine klinische Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse leitet sich von der wichtigen Rolle der hepatischen Synthesefunktion ab. Denkbar wäre die Vermeidung lebertoxischer Medikamente bei ADAMTS-13-Mangel Risikopatienten zur Protektion der sekretierenden Zellen.

Weiterhin deuten die Experimente auf eine komplexe Rolle des ADAMTS13 Enzyms im Rahmen der Leberfibrose und der Regulation zwischen den Zellarten hin, sodass auch bei diesem Patientenkollektiv eine besondere Beachtung der ADAMTS13-Aktivität indiziert sein kann.

Weitere interessante Ansätze resultieren aus der Vielzahl der pathologischen Veränderungen, z.B. der Sepsis und der chronisch entzündlichen Erkrankungen die über Enzymveränderungen bei einer TTP hinausgehen.

8 Schlussfolgerungen

1. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hepatischen Zelllinien Hep-G2 und LX-2 die von-Willebrand-Faktor spaltende Protease ADAMTS13 intrazellulär exprimieren und kontinuierlich sezernieren.
2. Nach TGF- β 1-Inkubation erhöhten sich die Expression von ADAMTS13 der Parenchymzelllinie Hep-G2 und die α -Smooth-Muscle-Actin-Expression der Zelllinie LX-2. Dies führt zu der Hypothese, dass TGF- β 1 an der Regulation der ADAMTS13-Synthese zwischen den Parenchymzellen und Stellatzellen der Leber in der Pathophysiologie der Leberfibrose beteiligt ist.
3. Die Experimente zur Stimulierung der ADAMTS13 Sekretion mit dem inflammatorischen Mediator Histamin und der spezifischen Hemmung von Typ1 und Typ2 Histaminrezeptoren zeigen, dass Histamin die Sekretion in hepatischen Parenchymzellen und Stellatzellen steigert und diese Wirkung hauptsächlich über Histaminrezeptoren des Typs H1 vermittelt wird.
4. Die Ergebnisse der Experimente zur Validierung der Signalkaskade deuten auf eine G-Protein-Rezeptor gekoppelte Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen PDGFR und Met durch Histamin hin. Dies ist eine zusätzliche Bestätigung, dass es sich um einen Rezeptor-medierten Vorgang handelt.
5. Die Histaminstimulation der Nabelschnur-Endothelzellen zeigte im Gegensatz zu der untersuchten Endothelzellkultur EA.hy926 einen signifikanten Anstieg des ADAMTS13-Signals bei ca. der Hälfte der bearbeiteten Nabelschnüre im Vergleich zu Kontrolle. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich dabei um einen physiologischen Vorgang handeln könnte.
6. Es konnten neue Erkenntnisse zur ADAMTS13-Expression und -sekretion an zwei Leberzelllinien gewonnen werden. Die beeinflussenden Faktoren wie TGF- β 1 und Histamin deuten auf einen komplexen Regulationsmechanismus der ADAMTS13-Synthese in der Leber hin.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Bedossa P, Paradis V. 1995. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *J Hepatol*, 22:37-42.
2. Bianchi V, Robles R, Alberio L et al. 2002. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 100:710-3.
3. Cal S, Obaya A, Llamazares M et al. 2002. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene*, 283:49-62.
4. Cao W, Niiya M, Zheng X et al. 2008. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 6:1233-5.
5. Castaman G, Federici A, Rodeghiero F et al. 2003. Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica*, 88:94-108.
6. Castilla A, Prieto J, Fausto N. 1991. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med*, 324:933-40.
7. Claus R, Bockmeyer C, Budde U et al. 2009. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost*, 101:239-47.
8. Crowther M, George J. 2008. Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2008 update. *Cleve Clin J Med*, 75:369-75.
9. Daub H, Weiss F, Wallasch C et al. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379:557-60.
10. Dent J, Galbusera M, Ruggeri Z. 1991. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest* 1, 88:774-82.
11. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3734 – 373.
12. Farrell D, Hines J, Walls A et al. 1995. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology*, 22:1175-81.
13. Federici A, Bader R, Pagani S et al. 1989. Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol*, 73:93-9.

14. Fischer O, Giordano S, Comoglio P et al. 2004. Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, 279:28970-8.
15. Friedman S. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88:125-72.
16. Friedman S. 1997. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol*, 32:424-30.
17. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B et al. 2001. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98:1662-6.
18. Furlan M. 1996. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol*, 72:341-8.
19. Furlan M, Robles R, Lämmle B. 1996. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87:4223-34.
20. Furlan M, Robles R, Morselli B et al. 1999. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 81:8-13.
21. Furlan M, Robles R, Solenthaler M et al. 1998. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 91:2839-46.
22. Geetha S, Allen C, Hunt R et al. 2009. Detection of intracellular ADAMTS13, a secreted zinc-metalloprotease, via flow cytometry. *Cytometry A*, 75:675-81.
23. Gerritsen H, Robles R, Lämmle B et al. 2001. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*, 98:1654-61.
24. Gressner A, Weiskirchen R, Breitkopf K et al. 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*, 7:d793-807.
25. Hamilton K, Sims P. 1987 Changes in Cytosolic Ca Associated with von Willebrand Factor Release in Human Endothelial Cells Exposed to Histamine. In: *J. Clin. Invest.*, 600-6008.
26. Hamilton T, Young R, McKoy W et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983; 43:5379-89
27. Hill S. 1990. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev*, 42:45-83.
28. Hill S, Ganellin C, Timmerman H et al. 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*, 49:253-78.

29. Hosler G, Cusumano A, Hutchins G. 2003. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*, 127:834-9.
30. Hough L. 2001. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol*, 59:415-9.
31. Ishii K, Suzuki O, Maruyama K et al. 1978. Therapeutic effect of histidine decarboxylase inhibitor on chronic active hepatitis. *Gastroenterol Jpn*, 13:105-10.
32. Jaffe E. 1982. Synthesis of factor VIII by endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci*, 401:163-70.
33. Kentouche K, Zintl F, Angerhaus D et al. 2006. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in the course of stem cell transplantation. *Semin Thromb Hemost*, 32:98-104.
34. Kume Y, Ikeda H, Inoue M et al. 2007. Hepatic stellate cell damage may lead to decreased plasma ADAMTS13 activity in rats. *FEBS Lett*, 581:1631-4.
35. Lee J, Lee K, Paik Y et al. 2003. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 39:960-6.
36. Levy G, Nichols W, Lian E et al. 2001. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413:488-94.
37. Lim H, Smits R, Leurs R et al. 2006. The emerging role of the histamine H4 receptor in anti-inflammatory therapy. *Curr Top Med Chem*, 6:1365-73.
38. Linseman D, Benjamin C, Jones D. 1995. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 270:12563-8.
39. Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R et al. 2007. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 138:651-62.
40. Manea M, Tati R, Karlsson J et al. 2009. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. *Pediatr Nephrol*, 25: 87-96.
41. Mannucci P, Canciani M, Forza I et al. 2001. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 98:2730-5.
42. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H et al. 2005. The role of histamine H1 receptor and H2 receptor in LPS-induced liver injury. *FASEB J*, 19:1245-52.
43. Moake J, Rudy C, Troll J et al. 1982. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 307:1432-5.
44. Moore J, Hayward C, Warkentin T et al. 2001. Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood*, 98:1842-6.

45. Moschcowitz E. 1924. Hyaline thrombosis of the terminal arteri-oles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *ProcNY Pathol Soc*, 24:21–4.
46. Moss J, Rosow C. 1983. Histamine release by narcotics and muscle relaxants in humans. *Anesthesiology*, 59:330-9.
47. Murrin R, Murray J. 2006. Thrombotic thrombocytopenic purpura: aetiology, pathophysiology and treatment. *Blood Rev*, 20:51-60.
48. Niiya M, Uemura M, Zheng X et al. 2006. Increased ADAMTS-13 proteolytic activity in rat hepatic stellate cells upon activation in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*, 4:1063-70.
49. Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, and Matsumoto S. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275:36781–36786.
50. Oleksowicz L, Bhagwati N, DeLeon-Fernandez M. 1999. Deficient activity of von Willebrand's factor-cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer Res*, 59:2244-50.
51. Parsons M, Ganellin C. 2006. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1:S127-35.
52. Peng J, Leng X, Wei Y. 1996. Changes of histamine receptors in the liver of the rat during the development of experimental cirrhosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 34:113-6.
53. Pimanda J, Hogg P. 2002. Control of von Willebrand factor multimer size and implications for disease. *Blood*, 16:185-92.
54. Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D et al. 2002. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*, 100:3626-32.
55. Pottinger B, Read R, Paleolog E et al. 1989. von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res*, 53:387-94.
56. Priya S, Sudhakaran P. 2008. Cell survival, activation and apoptosis of hepatic stellate cells: modulation by extracellular matrix proteins. *Hepatol Res*, 38:1221-32.
57. Remuzzi G, Galbusera M, Noris M et al. 2002. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 100:778-85.
58. Reynaert H, Thompson M, Thomas T et al. 2002. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*, 50:571-81
59. Ruggeri Z. 2001. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14:257-79.

60. Schlicker E, Kathmann M, Detzner M et al. 1994a . H3 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release: an investigation into the involvement of Ca²⁺ and K⁺ ions, G protein and adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 350:34-41.
61. Schlicker E, Malinowska B, Kathmann M et al. 1994b. Modulation of neurotransmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam Clin Pharmacol*, 8:128-37.
62. Shang D, Zheng X, Niiya M et al. 2006. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. *Blood*, 108:2207-15.
63. Shi Y, Fong C, Zhang Q et al. 2007. Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF-beta signaling pathway. *FEBS Lett*, 581:203-10.
64. Siedlecki C, Lestini B, Kottke-Marchant K et al. 1996. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*, 88:2939-50.
65. Soejima K, Mimura N, Hirashima M et al. 2001. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem*, 130:475-80.
66. Sporn L, Chavin S, Marder V et al. 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, 76:1102-6.
67. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y et al. 2004. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 313:212-6.
68. Thachil J. 2007. Thrombotic thrombocytopenic purpura: is there more than ADAMTS-13? *J Thromb Haemost*, 5:634-5.
69. Tsai H. 1996. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87:4235-44.
70. Tsai H, Lian E. 1998. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 339:1585-94.
71. Tsai H. 2003. Shear stress and von Willebrand factor in health and disease. *Semin Thromb Hemost*, 29:479-88.
72. Turner N, Nolasco L, Ruggeri Z et al. 2009. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release and VWF string cleavage. *Blood*, 114: 5102-11.
73. Turner N, Nolasco L, Tao Z et al. 2006. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 4:1396-404.
74. Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M et al. 2008. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost*, 99:1019-29.
75. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M et al. 2005. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*, 106:922-4.
76. Umezu K, Yuasa S, Sudoh A. 1985. Change of hepatic histamine content during hepatic fibrosis. *Biochem Pharmacol*, 34:2007-11.

77. Unanue E. 2007. Ito cells, stellate cells, and myofibroblasts: new actors in antigen presentation. *Immunity*, 26:9-10.
78. Wagner D. 1990. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*, 6:217-46.
79. Watanabe et al. 2009. **Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis**. *Thromb Haemost*, 102:389-396.
80. Weiss H, Sussman I, Hoyer L. 1977. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest*, 60:390-404.
81. Wetzker R, Böhmer F. 2003. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:651-7.
82. Xie L, Chesterman C, Hogg P. 2001. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med*, 193:1341-9.
83. Xu L, Hui A, Albanis E et al. 2005. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54:142-51.
84. Zheng X, Chung D, Takayama T et al. 2001. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276:41059-63.
85. Zhou W, Inada M, Lee T et al. 2005. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest*, 85:780-8.
86. Zimmerman T, Dent J, Ruggeri Z et al. 1986. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest*, 77:947-51.

10 Anhang

Messwerte der Experimente

In den nachfolgenden Tabellen sind die berechneten Mittelwerte der Messwerte (MW) als numerischer Wert vermerkt. Weiterhin sind die Standardabweichungen (Stand.Abw.) und die Ergebnisse des t-Tests angegeben.

Tabelle 6.6: Basissekretion der Zelllinien LX-2 und Hep-G2, angegebene Werte als Extinktion, (LW=Leerwert)

	MW-LW	Stand. Abw.	Zellzahl x 10e5
LX-2 24h	0,030	0,0091	1,16
LX-2 48h	0,041	0,0067	2,12
LX-2 72h	0,079	0,0038	3,43
LX-2 96h	0,205	0,0176	4,67
Hep-G2 24h	0,032	0,0086	1,99
Hep-G2 48h	0,065	0,0191	3,65
Hep-G2 72h	0,099	0,0182	6,25
HepG2 96h	0,138	0,0091	7,87

Tabelle 6.7: Sekretionsrate der Zelllinien LX-2 und Hep-G2, angegebene Werte als Extinktion

	LX-2	Hep-G2
24h	0,026	0,016
48h	0,019	0,018
72h	0,023	0,015
96h	0,044	0,017

Tabelle 6.8: ADAMTS13-Antigengehalt nach Kokultivierung der Zelllinien LX-2 und Hep-G2, angegebene Werte als Extinktion

	Monokultur	Kokultur
LX-2 (MW)	0,138	0,140
Stand.Abw.	0,013	0,012
t-test	Bezugsgröße	0,846
Hep-G2 (MW)	0,126	0,125
Stand.Abw.	0,019	0,007
t-test	Bezugsgröße	0,943

Tabelle 6.9: Einfluss von TGF- β 1 auf den ADAMTS13-Antigengehalt der Zelllinien LX-2 und Hep-G2, angegebene Werte als Extinktion.

	LX2	Stand. Abw.	t-test
Kontrolle	0,149	0,009	Bezugsgröße
1ng/ml	0,133	0,004	0,026
10ng/ml	0,149	0,007	0,934
100ng/ml	0,154	0,011	0,494

	Hep G2	Stand. Abw.	t-test
Kontrolle	0,157	0,014	Bezugsgröße
1ng/ml	0,245	0,024	0,001
10ng/ml	0,258	0,032	0,002
100ng/ml	0,293	0,051	0,003

Tabelle 6.12: Einfluss von TGF- β 1 auf den α -Smooth-Muscle-Actin-Antigengehalt der Zelllinie LX-2, angegebene Werte als Extinktion

LX2	MW	Stand. Abw.	t-test
Kontrolle	0,188	0,013	Bezugsgröße
1ng/ml	0,229	0,025	0,064
10ng/ml	0,221	0,015	0,030
100ng/ml	0,215	0,006	0,032

Keine Abbildung vorhanden: Einfluss von TGF- β 1 auf die Zellvitalität von LX-2 und Hep-G2 ermittelt im Alamar Blue Assay, Messwerte in %

	Kontrolle	1ng/ml	10ng/ml
LX-2	100,01	87,90	81,15
Stand. Abw.	6,71	8,69	3,59
Hep-G2	100,00	93,45	96,54
Stand. Abw.	6,56	5,93	6,59

Tabelle 6.13: Gleichzeitige Bestimmung von ADAMTS13 und α -Smooth-Muscle-Actin der Zelllinie LX-2 im Durchflusszytometer, Messwerte in %

	ADAMTS13 (%)	Aktin (%)
LX 2 Kontrolle	3,83	10
LX 2 Tag 1	56,71	48,01
LX 2 Tag 2	74,27	63,87
LX 2 Tag 3	76,77	54,42
LX 2 Tag 4	84,9	78,59
LX 2 Tag 5	83,66	77,07
LX 2 Tag 6	87,99	76,29
LX 2 Tag 4 unlysiert	18,11	5,19

Tabelle 6.14: ADAMTS13-Antigenkonzentration nach Histaminstimulation an verschiedenen Zelllinien, angegebene Werte als Extinktion

	LX-2	Hep-G2	Ea.hy926
Kontrolle	0,260	0,213	0,245
Stand.Abw.	0,0215	0,013	0,029
t-test	Bezugsgröße	Bezugsgröße	Bezugsgröße
10mM (MW)	0,309	0,421	0,257
Stand.Abw.	0,027	0,032	0,028
t-test	0,0498	0,0000	0,5927
20mM (MW)	0,392	0,464	0,205
Stand.Abw.	0,032	0,026	0,021
t-test	0,0016	0,0000	0,0923
30mM (MW)	0,362	0,510	0,240
Stand.Abw.	0,043	0,008	0,039
t-test	0,0132	0,0000	0,877

Keine Abbildung vorhanden: Einfluss von Histamin auf die Zellvitalität von LX-2, Hep-G2 und Ea.hy926 ermittelt im Alamar Blue Assay, Messwerte in %

	Hep G2	STABWN
0mM	100	5,74
10mM	96,21	5,09
20mM	66	6,69
30mM	30,83	8,09
40mM	22,79	6,37
50mM	23,87	5,92
	LX2	STABWN
0mM	101,92	5,68
10mM	93,01	7,21
20mM	84,99	4,42
30mM	68,38	8,89
40mM	31,65	8,71
50mM	30,72	9,43
	EA.hy 926	STABWN
0mM	100	5,58
10mM	69,90	5,21
20mM	61,32	4,62
30mM	56,85	8,74
40mM	49,86	9,57
50mM	52,59	7,28

Tabelle 6.15: Antagonisierung von H1 mit Dimetinden der Zelllinie Hep-G2, Messwerte in %

	Prozentualer Anteil MW	Stand. Abw.	t-test
Histamin (Kontrolle)	100	4,49	Bezugsgröße
200µg/ml Dimetinden + Histamin	80,14	9,83	0,00013

Tabelle 6.16: Antagonisierung von H1 mit Diphenhydramin der Zelllinie Hep-G2, Messwerte in %

	Prozentualer Anteil MW	Stand. Abw.	t-test
Histamin (Kontrolle)	99,93	5,80	Bezugsgröße
100µg/ml Diphenhydramin + Histamin	83,91	6,71	0,0001

Tabelle 6.17: Antagonisierung von H2 mit Ranitidin der Zelllinie Hep-G2, Messwerte in %

	Prozentualer Anteil MW	Stand.Abw.	t-test
Histamin (Kontrolle)	99,96	5,37	Bezugsgröße
Ranitidin 200µg/ml + Histamin	98,83	3,40	0,648
Ranitidin solid 2µg/ml + Histamin	96,77	4,39	0,246
Ranitidin solid 20ng/ml + Histamin	99,32	5,40	0,827

Tabelle 6.18: Antagonisierung von H3/H4 mit Thioperamid der Zelllinie Hep-G2, Messwerte in %

	Prozentualer Anteil	Stand.Abw.	t-test
Histamin (Kontrolle)	99,97	5,43	Bezugsgröße
Thioperamid 10µg/ml + Histamin	102,39	5,18	0,399
Thioperamid 0,1µg/ml + Histamin	99,26	8,13	0,851
Thioperamid 0,001µg/ml + Histamin	98,65	12,08	0,797

Tabelle 6.19: ADAMTS13-Ausschüttung nach Inkubation mit Histaminagonisten, angegebene Werte als Extinktion

	LX-2 unbehandelt	LX2 200µM Histaprodifen	LX2 5mM Dimaprit
Mittelwert	0,212	0,321	0,254
STABWN	0,0142	0,0232	0,0063
t-test	Bezugsgröße	0,0000	0,0000
	Hep-G2 unbehandelt	Hep-G2 200µMHistaprodifen	Hep-G2 5mM Dimaprit
Mittelwert	0,199	0,230	0,201
STABWN	0,0090	0,0088	0,0134
t-test	Bezugsgröße	0,0000	0,7332

Tabelle 6.20: ADAMTS13-Ausschüttung nach Inkubation mit Signalkaskadeninhibitoren, Messwerte in %

	Kontrolle	AG 1295	SU 11274	PD 98059	BIM I	SL 327
Prozentualer AnteilMW	102,88	71,42	81,22	80,6	85,8	96,89
STABWN	14,09	12,58	15,30	20,20	23,68	32,94
t-test		0,0001	0,0052	0,0986	0,0925	0,6320

Tabelle 6.21: Nabelschnurperfusionsexperiment, Messwerte in %

Probe	NS mit Histamin	Stand.Abw.	Kontrolle	Stand.Abw.	t-Test
1	113,64	2,37	100,05	4,54	0,00372
2	100,00	2,24	100,09	1,32	0,11098
3	159,04	4,97	99,90	4,90	0,00001
4	94,10	6,82	99,87	2,98	0,22621
5	131,52	7,95	99,80	7,85	0,00272
6	100,61	2,71	100,00	3,68	0,75857
7	102,42	8,99	100,08	10,58	0,78027

Die Nabelschnurproben 1-7 bezeichnen die 7 untersuchten Nabelschnüre. Ein Anstieg über 100% stellt eine Steigerung gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle dar.

Curriculum Vitae**Katharina Kunze****Angaben zu Person:**

Anschrift: Katharina Kunze
Fregestraße 2
07747 Jena

Geburtstag: 21.09.1985

Geburtsort: Plauen

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1992-1996 Dittes-Grundschule Plauen
1996-2004 Diesterweg-Gymnasium Plauen
04.07.04 Abitur (Note 1,5)

Berufsausbildung: 10.2004 -10.2006 Friedrich-Schiller Universität Jena
Vorklinisches Studium
10.2006 – 05.2011 Friedrich-Schiller Universität Jena
Klinisches Studium

Abschluss des Studiums der Humanmedizin am 26.05.11 mit der Note gut (2,0)

Dissertation:

Thema: Untersuchungen zur Regulation der ADAMTS13-Expression und –Sekretion in Leberzellen der Kulturlinien LX-2 und Hep-G2
(Experimentelle Arbeit in der Kinderklinik der FSU, hämatoonkologisches Labor)

Seit dem 01.10.2011 Assistenzärztin, Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Jena

Famulaturen: 03.2007 HNO-Klinikum Bethanien, Plauen
08./09. 2007 Klinik für Innere Medizin 1 (Pneumologie), UKJ Jena
09./10.2008 Institut für Pathologie, UKJ Jena
02./03.2009 Klinik für Anästhesiologie/Intensivtherapie, UKJ Jena

PJ-Tertiale: 22.02.2010-11.06.2010 Klinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie, UKJ Jena
14.06.2010-01.10.2010 Klinik für Neurologie, UKJ Jena
04.10.2010-21.01.2011 Klinik für Innere Medizin, Altenburg

Sonstiges:

Fremdsprachenkenntnisse:

Englisch: mittleres Sprachniveau

Französisch: Grundkenntnisse

Computer: MS Office

Interessen: Literatur

Jena, den 28.12.2011



Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. James Beck für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Astrid Voigt und Dr. Karim Kentouche bedanken, denn sie brachten mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter des Hämato-Onkologischen Labors der Kinderklinik Jena für die freundliche Aufnahme und speziell an Dr. Ralf Häfer für die Unterstützung am Durchflussszytometer.

Ein weitere Dank geht an Dr. Roland Kaufmann (Arbeitsgruppe: Allgemeine Viszeral- und Gefäßchirurgie, Jena) für die Bereitstellung der Signalkaskadeninhibitoren und kompetente Beratung und Hilfe bei der Interpretation.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Lydia Seyfarth und den Mitarbeitern des Plazentalabors (Leitung: Professor Schleussner) der Universitätsfrauenklinik Jena für die Bereitstellung der Nabelschnüre bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich Thomas Kaiser für die Kraft und Liebe, die er mir täglich aufs Neue schenkt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Betreuer: Prof. Dr. med. James Beck, Dr. Astrid Voigt und Dr. Karim Kentouche (Kinderklinik Universitätsklinikum Jena).

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 28.12.2011

Katharina Kunze